

---

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## INFECTION ET VACCINATION PAR VOIE TRACHÉALE

par A. BESREDKA.

### I

Dans un article récent nous avons montré que le sérum sanguin exerce la même action et agit avec la même rapidité, qu'il soit introduit dans la circulation générale ou dans le canal aérien (1).

L'expérience montre qu'il en est de même de toxines et poisons solubles. Nous avons pu nous assurer, en ce qui est du venin de cobra et de la toxine diphtérique, que la dose mortelle est sensiblement égale chez le cobaye et le lapin, que l'on choisisse la voie sanguine ou la voie respiratoire. Tout porte à croire que les choses se passent ainsi pour toutes les substances toxiques solubles; du moment qu'un corps est liquide, il traverse la couche alvéolaire sans être arrêté, tout comme si l'on en introduisait directement dans le sang.

La couche épithéliale pulmonaire se comporte tout autrement lorsqu'il s'agit de laisser passer un élément figuré. Elle l'intercepte, d'abord, en totalité; puis, à mesure que la solubilisation s'en poursuit, les portions passées en solution franchissent le

(1) Ces *Annales*, janvier 1920, p. 51.

filtre pulmonaire. Ce processus s'opérant à l'aide de globules blancs principalement s'accomplit plus ou moins vite, suivant la nature de l'élément en présence.

Tant qu'il est intact, le filtre pulmonaire est imperméable à la façon d'une bougie à pores serrées ; mais, il suffit de la lésion la plus minime pour que sa porosité augmente au point de rendre le filtre inopérant. Ainsi, au moyen de l'artifice dont nous usâmes autrefois pour renverser la barrière intestinale (1), on parvient à ouvrir aussi la barrière pulmonaire. Les expériences nous ont, en effet, montré que la bile de bœuf, qui, à la dose de  $1/2$  c. c. d'une solution au  $1/20$ , est bien supportée en injection laryngée, rend le lapin sensible à l'infection par la voie respiratoire : lorsque, le lendemain de cette « inspiration » de bile, on injecte dans la trachée du virus paratyphique B, on constate que la résistance de l'animal est bien loin d'être ce qu'elle est normalement.

Rappelons ici un fait que nous avons décrit chez les animaux sensibilisés par la bile, auxquels on fait une inoculation de virus dans les veines. Si pour un lapin neuf de 2 kilogrammes environ la dose mortelle de virus paratyphique, en injection intraveineuse, est de  $1/15$  —  $1/10$  de culture sur gélose, l'ingestion préalable de bile fait baisser la résistance naturelle d'au moins 5 fois, en ramenant ainsi la dose mortelle à  $1/50$ – $1/100$  de culture.

Nous retrouvons le même phénomène, mais plus accusé encore, en empruntant la voie pulmonaire.

Non préparé par la bile, le lapin manifeste une résistance tout à fait inattendue au virus paratyphique donné par la voie laryngée. Nous avons pu injecter impunément jusqu'à une demi-culture sur gélose ; même une culture entière ne le fait mourir qu'au bout de deux à trois jours ; le lapin neuf tolère donc par la voie pulmonaire beaucoup plus de virus que par la voie sanguine.

Cette tolérance, qui ne peut être due qu'à l'intervention du filtre alvéolaire, disparaît totalement dès que l'animal est sensibilisé par la bile. Ainsi l'expérience nous a montré que le lapin qui avait reçu de la bile par le larynx la veille, puis du virus le

(1) Ces *Annales*, août 1919, p. 557 ; décembre 1919, p. 882.

lendemain par la même voie, succombe à la dose de 1/100 de culture, c'est-à-dire à la dose 50 fois inférieure à celle qui tue le lapin normal; c'est aussi la dose qui, pour le lapin préparé par la bile, est mortelle en inoculation intraveineuse.

Il s'ensuit donc que le filtre pulmonaire, si efficace dans les conditions normales, ne fonctionne plus chez l'animal sensibilisé; tout se passe comme si ce filtre était perforé.

Cette expérience nous montre la différence de résistance entre un animal normal et sensibilisé; elle nous fait saisir également le rôle protecteur que l'appareil alvéolaire joue dans les conditions naturelles de vie.

En résumé :

Chez le lapin *normal*, la dose mortelle est de :

1/10 culture, en injection intraveineuse,

1 culture, en injection intratrachéale;

Chez le lapin *sensibilisé*, la dose mortelle est de :

1/50 — 1/100 culture, en injection intraveineuse,

1/50 — 1/100 culture, en injection intratrachéale.

Donc :

1° La sensibilisation par la bile, en privant l'animal de ses moyens naturels de défense, permet de se rendre compte de ce qu'est la résistance d'un animal « désarmé »; cette dernière, que l'on pourrait qualifier de « résistance propre », est invariable quelle que soit la porte d'entrée du virus;

2° Par la voie sanguine l'animal supporte une dose de virus au moins 5 fois supérieure à celle que comporte sa résistance propre;

3° Par la voie aérienne l'animal supporte une dose de virus au moins 50 fois supérieure à celle que comporte sa résistance propre.

Il en ressort donc que la part de l'épithélium respiratoire dans la défense naturelle de l'organisme est des plus importantes. Dans le filtre alvéolaire, les virus inspirés trouvent une barrière équivalente à celle que la muqueuse intestinale oppose aux virus ingérés (1). En assurant de la sorte la défense *locale*, les deux appareils contribuent à l'immunité naturelle de l'animal.

(1) Ces *Annales*, loc. cit.



## II

Etant donnée la présence, au niveau de l'appareil respiratoire, des cellules assurant l'immunité locale, étant donnée la possibilité de lever cette immunité par un artifice d'expérimentation, ne serait-il pas également possible d'exalter cette immunité locale, c'est-à-dire d'immuniser artificiellement l'appareil respiratoire, comme nous avons immunisé l'appareil intestinal, sans que l'organisme entier y prit part?

Nous nous sommes adressé, pour nous en assurer, à différents microbes. C'est sur le bacille diphtérique que nous nous arrêtons : il a l'avantage de ne pas donner lieu à la production d'anticorps, puis, même lorsqu'il est injecté à fortes doses sous la peau, de ne pas créer d'immunité active. Nous nous sommes servi de cultures de vingt-quatre heures sur gélose ordinaire.

En cherchant à nous rendre compte de la virulence de notre culture par diverses voies, nous ne manquâmes point de nous apercevoir que, vis-à-vis du bacille diphtérique, tout comme vis-à-vis du bacille paratyphique, la voie aérienne se montre notablement plus tolérante que la voie sanguine.

Tandis que la dose de 1/10 culture suffit pour tuer un cobaye de 500 grammes en injection intraveineuse, il faut toute une demi-culture (diluée dans 0 c.c. 5 d'eau) pour provoquer la mort en injection trachéale.

Une des expériences relatives aux essais d'immunisation locale est résumée dans le tableau ci-contre.

Il en résulte que :

1° Le cobaye A, qui avait reçu 3 injections de bacilles diphtériques morts *dans la trachée*, supporte dans la suite une dose sûrement mortelle de bacilles diphtériques vivants par la même voie; avant l'inoculation d'épreuve son sérum agglutinait à 1 : 80;

2° Le cobaye B qui avait reçu 3 injections de bacilles diphtériques tués *sous la peau*, même à doses doubles, succombe à l'inoculation intratrachéale de bacilles diphtériques vivants; avant l'inoculation son sérum agglutinait à 1 : 320.

L'immunité du cobaye A serait-elle due à une production

plus active des anticorps en cas de vaccination par la voie trachéale que par la voie sous-cutanée? Pour le savoir, nous avons procédé à l'expérience que voici.

Un cobaye A<sub>1</sub>, vacciné dans les mêmes conditions que le cobaye A et en même temps que lui, fut saigné le jour de l'inoculation (20/IV); son sérum (2 cent. cubes) fut injecté dans le péritoine d'un cobaye neuf. Le lendemain, ce dernier

COBAYE A	COBAYE B	TÉMOIN
16/III. 420 gr. 1/4 culture diphtérique chauffée (60° — 1 h.) dans la trachée.	16/III. 370 gr. culture diphtérique chauffée (60° — 1 h.) sous la peau.	"
30/III. 1/6 culture diphtérique chauffée (60° — 1 h.) dans la trachée	30/III. 1/3 culture diphtérique chauffée (60° — 1 h.) sous la peau.	"
9/IV. 1/2 culture diphtérique chauffée (60° — 1 h.) dans la trachée.	9/IV. 1 culture diphtérique chauffée (60° — 1 h.) sous la peau.	"
19/IV. Le sérum agglutine le bacille diphtérique à 1 : 80.	19/IV. Le sérum agglutine le bacille diphtérique à 1 : 320.	"
20/IV. 350 gr. 1/2 culture diphtérique <i>vivante</i> dans la trachée.	20-IV. 545 gr. 1/2 culture diphtérique <i>vivante</i> dans la trachée.	20/IV. 600 gr. 1/2 culture diphtérique <i>vivante</i> dans la trachée.
Survit . . . . .	21/IV. Mort. Sang stérile. Capsules surrénales congestionnées.	21/IV. Mort. Sang stérile. Capsules surrénales congest.

fut inoculé, ainsi qu'un cobaye témoin, avec une dose minima mortelle (1/10 culture) de bacilles diphtériques vivants *dans les veines*. Quarante-huit heures après, les 2 cobayes furent trouvés morts.

La résistance consécutive à la vaccination par la voie trachéale n'est donc pas due aux anticorps; elle ne peut être due qu'à une nouvelle propriété apparue au niveau de l'appareil pulmonaire, c'est-à-dire à l'immunité locale artificiellement acquise.



## III

La voie trachéale offre un autre avantage, celui de permettre une production d'anticorps particulièrement abondante et beaucoup plus durable que celle que comporte la voie veineuse. Nous ne nous occuperons ici que des anticorps tuberculeux.

Rappelons ce que nous avons écrit au début de cet article. Dans les cas d'injection d'antigènes liquides par la voie aérienne, tout se passe dans l'organisme comme si l'injection avait été faite directement dans le sang; ces antigènes traversent la membrane alvéolaire avec une rapidité telle que l'animal n'a pas le temps de s'apercevoir d'où ils lui arrivent : il réagit de la même façon, que les antigènes passent d'abord par la trachée, puis dans le sang, ou qu'ils pénètrent d'emblée dans la circulation.

L'animal réagit différemment en cas d'injection d'éléments figurés.

Suivant leur degré de digestibilité, ces derniers sont retenus plus ou moins longtemps par le filtre alvéolaire. Il en résulte, premièrement, que l'organisme résiste mieux aux virus (paratyphique, diphtérique) par la voie respiratoire que par la voie veineuse; deuxièmement, l'élaboration des anticorps ne s'effectue pas de la même façon par les deux voies. Ainsi, pour ne citer que les bacilles paratyphiques B, nous avons pu nous assurer que, à la suite de l'injection de ceux-ci dans la trachée, les anticorps agglutinants et préventifs persistent pendant des mois. (Cette question relative aux anticorps paratyphiques fait actuellement l'objet de recherches de notre collaborateur, le docteur Pfenninger).

Rappelons que nous avons déjà cherché autrefois à nous rendre compte, par la réaction de fixation, de ce qui se passe dans l'organisme des lapins et des cobayes lorsqu'on leur inocule des bacilles tuberculeux vivants (1). Au cours des recherches actuelles, nous ne nous sommes occupé que des bacilles tués et des tuberculines.

Il est admis que les bacilles tués et surtout les tuberculines sont de mauvais producteurs d'anticorps. Il résulte de nos ex-

(1) Voir le résumé de ces recherches dans l'article « Sérodiagnostic de la tuberculose », *Paris Médical*, 1<sup>er</sup> août 1914.

périences que cela n'est vrai que pour certains bacilles et certaines tuberculines. Lorsqu'on dispose d'antigènes appropriés, tant pour injecter l'animal que pour faire la réaction de fixation, on ne manque jamais de constater des anticorps, et leur accroissement dans le sérum peut être suivi avec la plus grande facilité. Afin de ne pas nous écarter du sujet, nous laisserons pour le moment de côté la question relative au choix de l'antigène, pour chercher seulement comment l'animal réagit suivant qu'on lui administre l'antigène tuberculeux sous forme soluble, semi-soluble ou insoluble.

L'antigène soluble, ou tuberculine, injecté à des lapins dans le sang, donne lieu à peu d'anticorps; la réaction de fixation est aussi faible que fugace. Comme on devait s'y attendre, vu son état liquide, la tuberculine ne détermine guère plus de réaction par la voie aérienne que par la voie sanguine.

L'antigène demi-soluble, que nous obtenons par dessiccation de la tuberculine, donne naissance à des anticorps faciles à révéler par la réaction de Bordet-Gengou. Celle-ci devient très nette vers le dixième jour et se maintient, en moyenne, pendant un mois. On observe peu de différence, que l'injection de l'antigène ait été faite par la voie sanguine ou aérienne.

Mais où les anticorps apparaissent avec une abondance toute particulière, c'est dans les cas d'injection d'antigène insoluble, c'est-à-dire de bacilles tuberculeux.

Les bacilles sur lesquels ont porté nos expériences provenaient de milieux différents : bouillon glycérimé, pomme de terre glycérimée, milieu à l'œuf. Les injections aux lapins étaient faites deux fois, à 5-8 jours d'intervalle, aux uns dans la trachée, aux autres dans la veine marginale de l'oreille. Tous les dix jours environ les lapins étaient saignés, et leurs sérums examinés au point de vue de leur capacité de fixer l'alexine en présence de plusieurs antigènes. Disons de suite que la fixation la meilleure a été obtenue avec la culture âgée de huit à dix jours en milieu à l'œuf. Nous faisons grâce au lecteur des détails de ces longues et minutieuses expériences; nous aurons d'ailleurs à y revenir. En voici le sens général.

Quelle que soit la provenance des bacilles, leur injection *dans le sang* provoque une succession de phénomènes invincible. Pendant les huit-dix premiers jours on n'aperçoit dans



le sérum aucun changement appréciable. Apparue vers le dixième jour, la réaction de fixation devient très prononcée (15-20 unités de Calmette, en moyenne) vers le quinzième jour. Elle se maintient à ce niveau pendant un mois. Vers le quarante-cinquième jour elle commence à baisser pour disparaître complètement vers le soixantième jour. Chez plusieurs lapins, la période de la réaction n'a duré en tout qu'un mois environ.

Le tableau est tout autre chez les animaux — lapins ou cobayes — injectés *dans la trachée*. Faisons remarquer que les injections de bacilles tuberculeux tués sont très bien tolérées par la voie respiratoire. Nous en avons introduit dans la trachée jusqu'à une culture entière en boîte de Roux (dans 4 cent. cubes) sans provoquer de gêne respiratoire appréciable.

Ce qui caractérise la réaction de fixation chez ces animaux, injectés dans la trachée, c'est son intensité et sa persistance. Lorsqu'on fait usage — pour injections intratrachéales — de bacilles âgés de plus de six semaines, provenant des milieux glycinés (bouillon et pomme de terre), la réaction de fixation peut être constatée dans le sérum pendant deux mois en moyenne. Mais c'est surtout lorsqu'on fait usage de corps de bacilles jeunes, âgés de dix jours au plus, provenant du milieu au jaune d'œuf, que la réaction se montre d'une intensité et d'une persistance tout à fait imprévues. A l'heure où nous écrivons, il s'est écoulé plus de six mois depuis que nous fîmes à un de nos lapins la seconde injection de bacilles tuberculeux dans la trachée; il n'en continue pas moins de fixer l'alexine à un degré très élevé. Jamais, au cours de nos recherches sur d'autres microbes, il ne nous fut donné d'assister à une production d'anticorps aussi abondante et surtout aussi durable.

Que signifient ces anticorps?

Sont-ils l'expression de l'immunité générale acquise à la suite de l'injection trachéale? S'établit-il en même temps une immunité locale pulmonaire? Faut-il considérer ces anticorps plutôt comme des témoins des réactions cellulaires contre les produits toxiques excrétés par les bacilles (1)?

Il appartient à l'avenir de nous le dire.

(1) A. CALMETTE, L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux. Masson, 1920, p. 509.



En résumé :

L'appareil pulmonaire est impuissant à empêcher les toxines et les poisons solubles de pénétrer rapidement dans la circulation générale; il oppose, en revanche, une barrière solide à la pénétration de virus figurés.

En mettant en regard, d'une part, la résistance de l'animal à l'inoculation dans la trachée et, d'autre part, celle qu'il présente lors de l'inoculation du même virus dans les veines, on se rend compte de l'importance de la barrière pulmonaire.

La solidité de cette dernière peut être évaluée en chiffres pour peu que l'on rapproche les effets de l'inoculation dans la trachée chez l'animal normal et chez l'animal sensibilisé. Il résulte de ce rapprochement que la barrière pulmonaire, lorsqu'elle est intacte, vaut à l'animal l'avantage de résister à la dose de virus 50 fois supérieure à celle qui tue l'animal privé de sa défense pulmonaire. Ce chiffre donne l'idée de la part de contribution que l'appareil respiratoire apporte à l'organisme pour assurer son immunité naturelle.

Cette part de contribution est susceptible d'être accrue artificiellement : en portant des vaccins directement au niveau de l'appareil respiratoire, on peut exalter la résistance naturelle, on peut créer une immunité artificielle locale.

Les corps des bacilles tuberculeux sont tolérés par la voie aérienne à des doses massives et répétées. Cette immunité naturelle locale est-elle susceptible d'être exaltée par des injections intratrachéales répétées? Nous ne saurions le dire pour le moment; mais, ce que nous pouvons affirmer, c'est que les injections de bacilles tuberculeux par la voie trachéale donnent naissance à des anticorps beaucoup plus abondants et beaucoup plus persistants que ceux que l'on obtient par n'importe quel autre mode d'inoculation.

En terminant, nous tenons à remercier notre préparateur M. Pierre Laval de son aide aussi dévouée que précieuse.

# DE LA PATHOGENIE DU CHOLÉRA

TROISIÈME MÉMOIRE

## LE PROTÉIDE DU VIBRION CHOLÉRIQUE

par le Prof. G. SANARELLI,

Directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.

### I

#### Pauvreté de nos connaissances sur la nature et sur le mode d'action du « poison cholérique » :

Nous avons vu, dans le mémoire précédent, qu'à l'autopsie des cobayes morts de ce qu'on appelle la « péritonite cholérique », ni les tableaux bactériologiques de la sérosité péritonéale ni les cultures du sang ne suffisent à expliquer la cause de la mort.

C'est pourquoi beaucoup d'auteurs ont pensé à la possibilité d'une intoxication générale plutôt qu'à l'évolution d'un processus bactérien local. Et comme on attribue généralement au choléra de l'homme le caractère d'une intoxication, la plupart des auteurs ont été amenés à envisager également le processus péritonéal des cobayes.

Mais les études faites jusqu'ici sur la toxine des vibrions n'ont pas apporté un appui très convaincant à cette manière de voir.

Malgré les recherches de nombreux auteurs sur la nature et sur l'action du poison cholérique, il règne encore à ce sujet une grande incertitude.

On a cru longtemps que le poison cholérique était complètement lié au corps même des vibrions et que, seule, la mort des vibrions pouvait l'en séparer (Cantani, Gamaleia, Pfeiffer).

Le pouvoir toxigène des vibrions a même été fortement



contesté, surtout par Pfeiffer et ses élèves. Kraus (1) a été jusqu'à affirmer qu'il faut regarder comme non cholérigène le vibron capable de produire un poison soluble !

Mais, plus tard, le travail de Ransom (2), et plus spécialement, les travaux successifs de Metchnikoff, Roux et Salimbeni (3), de Brau et Denier (4) ont mis hors de doute l'existence d'un « poison cholérique », soluble et diffusible, produit par les vibrions vivants.

Ce poison soluble n'est pas cependant assez actif pour que l'on puisse le comparer, même de loin, à celui qu'élaborent des agents de maladies incontestablement toxiques, et pour justifier la violence imposante et caractéristique de la symptomatologie cholérique.

A part la question préjudicielle que l'on pourrait poser dès maintenant, à savoir si le « poison du choléra » doit être identifié avec la substance ou les substances toxiques tirées des cultures des vibrions cholériques, il est à croire que tout le désaccord entre ceux qui admettent et ceux qui nient la production d'un poison vibronien soluble se réduit à une question de forme plutôt que de fait.

De fait, à côté de vibrions dont la toxicité très élevée est tenacement liée au protoplasme bactérien, comme le vibron désormais fameux de « Massaouah », avec lequel Pfeiffer (5) a effectué ses expériences bien connues sur le « poison du choléra », il existe d'autres vibrions, comme celui de « Nasik » étudié par R. Kraus (6), comme celui de la « Prusse Orientale » étudié par Metchnikoff, Roux et Salimbeni (7) comme ceux d'« El Tor », étudiés par Kraus et Pibram (8), comme celui de « Saïgon », étudié par Brau et Denier (9) qui, même dans

(1) Ueber Cholera-vibrionen und verwandte Vibrionen. *Centr. für Bakter.*, 1906, Beilage zu 38, p. 86.

(2) Cholera gift und Cholera antitoxin. *Deutsche. med. Woch.*, 1895, p. 457.

(3) Toxine et antitoxine cholériques. *Ces Annales*, 1896, p. 257.

(4) Recherches sur la toxine et l'antitoxine cholériques. *Ces Annales*, 1906, p. 578.

(5) Untersuchungen über Cholera gift. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1895, 11, p. 393.

(6) Ueber ein akut wirkendes Bakterientoxin. *Centralbl. f. Bakter.*, 1903, 34, p. 488.

(7) *Loc. cit.*

(8) Zur Frage der Toxinbildung des Cholera-vibrio. *Wiener. klin. Woch.*, 1905, p. 999.

(9) *Loc. cit.*

les cultures en bouillon, donnent des produits solubles plus ou moins actifs, surtout si on a exalté au maximum la virulence des vibrions.

Mais comme, dans un cas et dans l'autre, on se trouve toujours en face de produits toxiques qui résistent à la température de 100°, il est évident que leur principe actif, probablement analogue, ne peut être comparé aux exotoxines bactériennes, comme celles de la diphtérie, du tétanos, etc., ni aux phytotoxines comme la ricine, l'abrine, etc.

Il s'agit donc d'antigènes protéiniques très complexes, c'est à-dire d'endotoxines, qui se prêtent bien à la préparation d'excellents sérums antibactériens, mais qui sont peu propres à la production d'antitoxines véritables.

C'est peut-être aussi pour cela que, jusqu'ici, malgré tous les efforts possibles, on n'a pas réussi à obtenir un sérum antivibronien doué de propriétés antitoxiques satisfaisantes.

En tout cas, afin d'établir plus sûrement les causes de la mort dans la « péritonite cholérique » des cobayes, il était nécessaire de compléter les recherches précédentes par l'étude un peu plus exacte de ces endotoxines.

## II

### Le protéide vibronien : préparation, nature et action toxique.

Nous avons déjà dit que la toxicité du vibron de l'Isonzo n'est pas très élevée.

Celle de ses cultures en bouillon filtré est presque insignifiante.

Je n'ai pas cru nécessaire d'exalter la virulence initiale de ce microbe.

On sait que le pouvoir toxigène d'un vibron n'est pas en rapport avec la gravité de l'attaque cholérique qu'il a déterminée. Il n'est pas rare, en effet, d'isoler des vibrions très toxiques dans des cas de choléra bénins, tandis que dans des cas



de choléra très graves on n'isole parfois que des vibrions peu actifs (1).

Metchnikoff (2) a observé que la réceptivité de l'homme pour le choléra n'a aucun rapport constant avec la virulence du vibron à l'égard des animaux de laboratoire.

Kruse (3) a remarqué également que l'exaltation de la virulence des cultures vibrioniennes n'en augmente pas la toxicité.

J'ai au contraire cherché à expérimenter sur les cobayes et sur les lapins la seule action toxique du vibron, en me rapprochant autant que possible des conditions où cette action semble pouvoir se manifester dans l'évolution du processus péritonéal.

Dans ce but, j'ai essayé sur les animaux des cultures développées sur gélose, puis tuées à 56°, mais plus spécialement des cultures développées également sur gélose, puis solubilisées sans les chauffer, par une méthode facile de bactériolyse qu'après plusieurs essais j'ai trouvée la plus propre et la plus recommandable pour obtenir le protéide cholérique, aussi analogue que possible à celui qu'on suppose pouvoir se former dans la cavité péritonéale du cobaye, à la suite de l'action dissolvante de la cytase sur le corps des vibrions.

L'absorption d'un poison protéinique rendu soluble sans l'intervention de températures élevées et d'énergiques réactifs chimiques aurait dû être jugée plus facile et plus rapide, et son action sur l'organisme plus proche de celle causée par les mêmes microbes vivants.

#### *Mode de préparation.*

Une culture de vibrions de vingt-quatre heures, sur gélose à 37°, est émulsionnée dans 9 cent. cubes d'une solution de carbonate de soude à 0,1 p. 100; on y ajoute 1 cent. cube d'une solution de pancréatine à 1 p. 100; on verse dans le tube 4 à 5 gouttes de toluène, on agite fortement et on place dans l'étuve à 37°.

(1) SALIMBENI, Vaccination et sérothérapie anticholériques. *Médicaments microbiens*, Paris, Ed. Baillière, 1912, p. 418.

(2) Recherches sur le choléra et les vibrions. Ces *Annales*, 4<sup>e</sup> Mémoire, 1894, p. 538.

(3) Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig, 1910, p. 932.

Le lendemain on constate que le toluène s'est évaporé et que l'émulsion vibronienne s'est transformée en 10 cent. cubes de liquide très transparent d'aspect légèrement opalin, d'une densité ressemblant à celle d'une faible solution mucilagineuse.

Tous les vibrions, préalablement tués par le toluène, sont attaqués et dissous en vingt-quatre heures par la pancréatine. Le ferment pancréatique est incapable de dissoudre les vibrions vivants.

L'examen microscopique du liquide, desséché sur lamelle et coloré par la fuchsine phéniquée, montre seulement un réseau très fin de substance muqueuse et une poussière chromatique très ténue, résidu de la dissolution des corps bactériens.

A l'examen avec l'ultra-microscope, on n'aperçoit que de pâles et rares taches, à peine visibles, et quelques micelles granulaires très ténues et immobiles.

La facilité avec laquelle on peut préparer jour par jour de grandes quantités de ces tubes de protéide vibronien dissous rend aisée son étude chimique et son expérimentation sur les animaux.

Dans ces expériences, on peut considérer comme négligeables les très faibles quantités de pancréatine (0 gr. 01) et de carbonate de soude (0 gr. 001) présentes dans chaque tube contenant une culture entière de vibrions dissoute dans 10 cent. cubes de liquide alcalin. La pancréatine est notoirement inoffensive, même si on l'injecte dans les veines à de très fortes doses. Un cobaye de 300 grammes supporte, sans éprouver aucun trouble, l'injection endoveineuse d'une dose de pancréatine cent fois plus forte (1 gr.) que celle indiquée ci-dessus!

D'autre part, le traitement qu'on fait subir aux corps bactériens par cette simple et inoffensive méthode de bactériolyse est infiniment préférable au traitement employé couramment, proposé par Büchner (1) dès 1890, pour la préparation de sa « Bakterienproteine » et, plus tard, adopté par

(1) Die Bakterienproteine und deren Beziehung zur Entzündung und Eiterung. *Centralblatt f. Chirurgie*, 1890, n° 50. Voir également : KRAUS et LEVANNI, *Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung*. Iena, 1908, p. 373.



d'autres auteurs dans la préparation de ce qu'on appelle les « nucléo-protéides » du protoplasme de différents microbes pathogènes. On sait que cette méthode, très brutale, implique le contact des corps bactériens avec des solutions relativement très fortes et peut-être pas inoffensives, de soude caustique (1 p. 100), et exige la neutralisation par l'acide acétique etc.

### *Propriétés physico-chimiques.*

La substance complexe constituant le corps des vibrions, dissoute par le procédé susdit, se trouve dans le liquide sous sa forme colloïdale.

Elle précipite, en effet, par l'alcool et le sulfate d'ammoniaque, jusqu'à ce qu'elle en soit saturée. Ces deux propriétés appartiennent aux colloïdes ou pseudo-solutions, non aux solutions vraies et moléculaires.

Elles appartiennent, en outre, aux colloïdes biophiles comme les organiques, parce qu'elles ne se séparent de la solution que quand l'alcool et le sulfate d'ammoniaque ont atteint une concentration très élevée de façon à les déshydrater et à rendre possibles les concentrations micellaires.

Quant à la nature chimique du poison vibrionien, je dirai que, séparé au moyen du sulfate d'ammoniaque, recueilli sur filtre et lavé soigneusement avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque, afin d'éliminer les substances étrangères, il révèle la présence du phosphore; hydraté avec de l'acide sulfurique, il donne des bases puriniques qui se révèlent par le nitrate d'argent.

Tout fait donc penser que le protéide vibrionien, obtenu par la méthode susdite, se trouve, comme toutes les substances congénères, à l'état de solution colloïdale.

Et comme ce protéide, expérimenté sur les animaux, démontre, ainsi que nous le verrons plus loin, qu'il a conservé toutes ses propriétés antigènes spécifiques et son pouvoir toxique, il faut croire que l'action de la pancréatine sur le protoplasme des vibrions morts, dans un milieu alcalin, se manifeste en dissolvant simplement les parois cellulaires des vibrions et en mettant en liberté, intact, le protéide qui contient la véritable substance toxique.

*Pouvoir antigène.*

Ce qu'il y avait de plus important, c'était de vérifier que les corps des vibrions dissous par la digestion pancréatique n'avaient pas perdu leur pouvoir antigène ni subi sensiblement de modifications dans ce pouvoir.

La manière pratiquement la plus simple de s'en rendre compte, c'était d'employer les cultures digérées, dans l'immunisation des animaux, en essayant de temps en temps le degré du pouvoir agglutinant atteint par le sérum de sang de ces animaux.

Dans ce but, je choisis un certain nombre de robustes lapins adultes et j'en formai trois groupes.

Aux lapins du premier groupe, on pratiqua des injections périodiques sous-cutanées de cultures dissoutes par la pancréatine; à ceux du deuxième groupe, des injections sous-cutanées de cultures dissoutes par la pancréatine, puis chauffées pendant une demi-heure à 56°; à ceux du troisième groupe (témoins), des injections sous-cutanées de cultures sur gélose de vingt-quatre heures reprises avec une solution physiologique et chauffées simplement à 56°.

Les injections étaient faites à la dose d'une culture, digérée ou non, tous les deux jours.

Sauf de légères et transitoires diminutions de poids, les lapins supportent généralement très bien ces injections et pendant plusieurs mois de suite.

Les tableaux qui suivent donneront une idée comparative des résultats obtenus.

**1<sup>er</sup> GROUPE. — Lapins inoculés sous la peau avec cultures de vibrions dissous par la pancréatine.**

LAPIN N° 32. — 1 KILOGR. 400			LAPIN N° 34. — 1 KILOGR. 530		
Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids	Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids
		kilogr.			kilogr.
9 <sup>e</sup>	1 : 200	1,300	10 <sup>e</sup>	1 : 100	1,500
17 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,300	16 <sup>e</sup>	1 : 800	1,650
23 <sup>e</sup>	1 : 800	1,450	40 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,730
47 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,500	63 <sup>e</sup>	1 : 500	1,780



LAPIN N° 39. — 1 KILOGR. 310			LAPIN N° 40. — 1 KILOGR. 350		
Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids	Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids
		kilogr.			kilogr.
8 <sup>e</sup>	1 : 600	1,320	8 <sup>e</sup>	1 : 200	1,400
14 <sup>e</sup>	1 : 600	1,350	14 <sup>e</sup>	1 : 600	1,420
38 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,410	38 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,530
62 <sup>e</sup>	1 : 1500	1,500			

2<sup>e</sup> GROUPE. — Lapins inoculés sous la peau avec cultures de vibrions dissoutes par la pancréatine et chauffées pendant 30 minutes à 56°.

LAPIN N° 27. — 1 KILOGR. 500			LAPIN N° 28. — 1 KILOGR. 645		
Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids	Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids.
		kilogr.			kilogr.
9 <sup>e</sup>	1 : 200	1,400	9 <sup>e</sup>	1 : 200	1,380
18 <sup>e</sup>	1 : 800	1,360	18 <sup>e</sup>	1 : 600	1,500
24 <sup>e</sup>	1 : 2500	1,550	23 <sup>e</sup>	1 : 600	1,230
48 <sup>e</sup>	1 : 3000	1,720	Mort de pneumonie dans la 23 <sup>e</sup> journée.		
72 <sup>e</sup>	1 : 1500	1,780			

3<sup>e</sup> GROUPE. — Lapins inoculés sous la peau avec cultures de vibrions chauffés pendant 30 minutes à 56° (témoins).

LAPIN N° 29. — 1 KILOGR. 600			LAPIN N° 33. — 1 KILOGR. 800		
Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids	Journées de traitement	Pouvoir agglutinant du sérum	Variations du poids
		kilogr.			kilogr.
9 <sup>e</sup>	1 : 100	1,550	9 <sup>e</sup>	1 : 100	1,700
18 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,600	18 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,820
24 <sup>e</sup>	1 : 2500	1,620	24 <sup>e</sup>	1 : 1000	1,780
48 <sup>e</sup>	1 : 3000	1,680	48 <sup>e</sup>	1 : 1000	2,000

L'examen de ces résultats, tout en confirmant le fait déjà connu que les animaux ne réagissent pas d'une façon uniforme aux injections de substances immunisantes, démontre cependant que le pouvoir antigène des cultures vibrionniennes dissoutes par la pancréatine se manifeste fort bien.

En certains cas, il peut amener dans le sérum du sang des lapins l'apparition d'agglutinines spécifiques, dans une mesure supérieure à celle obtenue dans le sérum des lapins vaccinés par la méthode usuelle, c'est-à-dire avec des cultures vibroniennes simplement chauffées.

Le haut degré de pouvoir agglutinant atteint par le sérum du lapin n° 27 prouve en outre que les cultures vibroniennes dissoutes par la pancréatine, même si on les chauffe à 56°, peuvent conserver le même pouvoir antigène des cultures vibroniennes intactes, simplement chauffées.

Ces résultats autorisent à supposer que même le protéide contenu dans les cultures digérées, chauffé ou non, peut n'être pas substantiellement différent du protéide présent dans les cultures simplement reprises avec une solution physiologique et chauffées à 56°.

#### *Action toxique.*

On sait que l'endotoxine des vibrions est très stable. Les vibrions conservent leur toxicité intacte, même si on les soumet pendant 10-20 heures de suite à la digestion peptique et pancréatique.

Les expériences de Ch. Sluyts (1) ont, en effet, démontré que les cultures vibroniennes soumises à une digestion pancréatique prolongée dans une solution de carbonate de soude dix fois plus forte que celle que j'ai employée, c'est-à-dire à 1 p. 100, ne modifient nullement leur pouvoir toxique envers les lapins et les chiens.

J'ai voulu expérimenter l'action toxique de ces cultures vibroniennes solubilisées par la pancréatine, sur les cobayes et les lapins, par voie sous-cutanée, péritonéale et endo-veineuse.

#### *Expériences sur les cobayes.*

Les injections sous-cutanées sont tolérées, même à de fortes doses, et ne donnent lieu à aucune manifestation morbide générale digne de remarque.

(1) Etudes sur les propriétés du poison du choléra asiatique. *La Cellule*, 1894, 10, p. 187.

Les injections péritonéales sont également tolérées en grandes quantités. Des cobayes pesant 320-350 grammes peuvent recevoir dans le péritoine, en une seule fois, sans présenter aucune variation de poids, 4 et même 5 cultures solubilisées, c'est-à-dire 40-50 cent. cubes de protéide toxique. Un cobaye de 320 gr. a supporté impunément, dans l'espace de cinq jours, deux injections de 5 cultures solubilisées : c'est-à-dire 100 cent. cubes de liquide toxique. Tué sept jours après la deuxième injection, on a constaté que son poids, depuis le jour de la première injection, avait augmenté de 40 grammes ! Dans le péritoine, on lui trouva les signes d'une légère péritonite chronique diffuse : l'épiploon était épaissi et adhérent à la surface du foie ; le faible exsudat péritonéal était riche en grands leucocytes mononucléaires.

En somme, ces injections n'offrent pas de résultats différents de ceux qu'on obtient en injectant dans le péritoine des cobayes des solutions au 2 p. 100 de nucléinate de soude (acide nucléinique) du commerce.

Ces expériences ne jettent donc aucune lumière sur le mécanisme de la prétendue intoxication vibrionienne chez les cobayes.

Quoique l'absorption du liquide injecté dans la cavité péritonéale des cobayes s'effectue réellement et avec elle — comme on peut le constater par le degré du pouvoir agglutinant acquis par le sérum — s'opère aussi le passage dans le sang des principes spécifiques, c'est un fait que l'action toxique générale ne se manifeste d'aucune façon, pas même par une légère diminution du poids de l'animal.

Puisque, comme nous allons le voir, les cultures vibrioniennes dissoutes par la pancréatine possèdent, au contraire, une action toxique réelle et considérable, on pourrait croire que le protéide des vibrions, injecté dans la cavité péritonéale, après avoir été absorbé, se neutralise en grande partie dans le foie.

Mais, bien plus vraisemblable paraît l'idée d'une action atténuatrice exercée par l'épiploon.

On sait que les cavités séreuses, quoique douées d'un pouvoir absorbant presque égal à celui des veines, sont susceptibles, dans une certaine mesure, de diminuer la toxicité des produits injectés.



Les expériences de Giurianna (1), de Pirone (2) et de Cioffi (3) tendraient à attribuer ce véritable pouvoir antitoxique à l'action protectrice de l'épiploon.

Une expérience de Cioffi est assez probante à cet égard.

Injectant, dans les veines d'un lapin, du sérum de veau, il constate que la mort survient en peu de temps. Or la même quantité du même sérum, injectée dans le péritoine d'un lapin d'un poils inférieur au premier, est compatible avec une longue survie.

Tout autres sont les résultats que fournissent les injections endoveineuses faites dans les jugulaires.

On pourra en juger par la lecture des protocoles de ces trois expériences, qui sont démonstratives.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Cobaye A de 360 grammes, 31 vibrions, 20 heures. Injection endoveineuse de 1 culture cholérique solubilisée.

L'injection ne donne lieu à aucun accident immédiat; une heure après, l'animal est en hypothermie et manifeste un fort météorisme; l'abdomen est sensible. A 21 h. 30, la température rectale est descendue à 33°; à 23 h. 30, elle est descendue encore à 32°.

Le lendemain matin, le cobaye est abattu, sa température rectale ne dépasse pas 32°. Il meurt en collapsus à 17 heures, c'est-à-dire 21 heures après l'injection du protéide cholérique.

*Autopsie* (exécutée aussitôt).

Abondant transsudat séreux dans le péritoine. L'examen de ce transsudat révèle une assez forte quantité de leucocytes et divers globules rouges. La muqueuse gastrique est tachée de points noirâtres qui correspondent à des hémorragies capillaires et à de petites érosions de la muqueuse. Toutes les anses intestinales sont rouges, arborisées, fortement hyperhémiques. La paroi et la muqueuse de l'intestin grêle est couleur lie de vin, le contenu est diarrhémique et très riche en leucocytes et en cellules épithéliales desquamées. L'iléum aussi est très rouge et hyperhémique. Le cæcum est également hyperhémique et ses plaques lymphatiques paraissent grossies. La membrane mésentérique, où sont distribuées les acini de la glande pancréatique, paraît énormément œdémateuse. Les glandes mésentériques sont rouges et hémorragiques. Faible transsudat séreux dans les plèvres. Œdème répandu autour de la glande thymus. Vessie urinaire contractée et vide. Capsules surrénales hyperhémiques. Rate normale.

Lesensemencements du sang et du péritoine restent stériles.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Cobaye B de 320 grammes, 24 vibrions, 10 heures. Injection endoveineuse de deux cultures cholériques solubilisées.

(1) Sulle funzioni del grande epiploon. *Giorn. Intern. d. Sc. Med.* 1901, nos 14-15.

(2) Sulla fisiopatologia del grande epiploon. *La Riforma medica*, 1905, p. 8.

(3) Nuove ricerche sulla funzione protettiva dell'epiploon. *Ibidem*, p. 566 et 395.

A 15 heures, l'animal est très abattu, présente une très vive sensibilité abdominale et de l'hypothermie. Il meurt en collapsus à 21 heures, c'est-à-dire 11 heures après l'injection du protéide.

*Autopsie* (exécutée aussitôt).

Faible quantité de liquide séreux hématique dans le péritoine. Les acini de la glande pancréatique paraissent immergés dans une imposante infiltration œdémateuse de la membrane mésentérique. L'estomac présente une forte sécrétion catarrhale. Toutes les anses intestinales sont très congestionnées, hémorragiques, avec un contenu diarrhéique plein de lambeaux et de blocs de muqueuse épithéliale desquamée. Le jéjunum est plus particulièrement atteint : sa couleur est lie de vin ; sa muqueuse est tuméfiée et œdémateuse ; ses plaques de Peyer sont grossies et couleur lie de vin ; son contenu épais et de couleur brunâtre présente beaucoup de globules rouges, de leucocytes, de lambeaux de muqueuse desquamée, de revêtements de villosités, etc. L'iléon et le cæcum sont aussi de couleur rouge, hyperhémiques et diarrhéiques. Vésicule biliaire à moitié vide avec liquide biliaire plein d'éléments épithéliaux desquamés. Capsules surrénales injectées. Vessie urinaire complètement rétractée et vide. Rate petite, un peu plus rouge que normalement.

Les ensemcements du sang et du péritoine restent stériles ; ceux du contenu intestinal révèlent une notable augmentation de streptocoques et de *B. coli*.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Cobaye C de 380 grammes, 29 vibrions, 10 heures. Injection endoveineuse de trois cultures cholériques solubilisées. Une heure après l'injection, la température rectale est descendue de 39°5 à 33° ; l'animal est très abattu, présente du météorisme et une forte sensibilité abdominale. Ces symptômes s'aggravent progressivement jusqu'à la mort, qui arrive à 17 heures, c'est-à-dire 7 heures après l'injection de protéide.

*Autopsie* (exécutée aussitôt).

Faible sérosité sanguinolente dans la cavité péritonéale. Les acini de la glande pancréatique sont enveloppés, comme d'habitude, du curieux œdème gélatineux. Tableau abdominal imposant : toutes les anses intestinales sont hyperhémiques, flasques et diarrhéiques, sur certains points, de couleur rosé et brunâtre. Leur contenu est fluide, muqueux ou diarrhéique, plein d'éléments épithéliaux et de leucocytes. La muqueuse gastrique est également tuméfiée, œdémateuse, parsemée d'hémorragies punctiformes et de véritables pétéchies. On trouve, en somme, tous les signes d'une *gastro-entérite très aiguë*. L'épiploon et l'utérus sont, eux aussi, congestionnés, rougis, œdémateux. La vésicule biliaire et la vessie urinaire sont contractées et vides. La rate est un peu plus rouge que normalement.

Les ensemcements du péritoine et du sang restent stériles ; ceux du contenu intestinal révèlent une notable augmentation de colibacilles et la présence de nombreux streptocoques.

### *Expériences sur les lapins.*

L'étude de l'action toxique exercée sur les lapins par le protéide des vibrions donne des résultats moins précis et moins constants que sur les cobayes.

Le tube digestif du lapin réagit toujours beaucoup moins que celui du cobaye, sous l'action de tous les poisons microbiens, y compris celui du bacille virgule.

Contrairement à ce qu'on a observé sur les cobayes, les injections endoveineuses qui, dans ces derniers animaux, provoquent des lésions anatomiques constantes, graves et significatives, ne donnent, chez les lapins, que des résultats peu précis.

Souvent les animaux meurent vite, presque d'une façon foudroyante, en présentant des lésions générales importantes, mais imputables à des phénomènes anaphylactiques. Nous aurons occasion de revenir sur ces phénomènes.

Quand la mort n'arrive pas d'une façon aussi soudaine, l'injection endoveineuse du protéide, même à dose égale, ne donne pas de résultats très différents de ceux qu'on obtient après les injections dans le péritoine.

Il m'a même paru que, chez les lapins, contrairement à ce qui se produit chez les cobayes, cette voie est préférable à celle des veines. Les effets des injections péritonéales m'ont semblé plus constants et plus démonstratifs.

Je dirai plus : les injections péritonéales de protéide en solution colloïdale sont, même à dose égale, plus toxiques que les injections de cultures simplement tuées par la chaleur ou par le toluène.

La quantité de protéide vibronien nécessaire pour tuer un lapin d'un poids moyen de 1200-1500 grammes est non seulement très considérable, mais aussi inconstante.

Si l'on injecte dans le péritoine d'un lapin 5-6 cultures cholériques solubilisées, l'animal, tout en ne présentant aucun symptôme apparent, commence aussitôt à diminuer de poids, cesse de manger et meurt après 4-5 jours.

A l'autopsie, on trouve tout l'appareil digestif plus ou moins lésé; l'estomac est réduit de volume et, en outre du faible résidu des aliments, contient beaucoup de liquide aqueux et beaucoup de mucosités. Toutes les anses intestinales, flasques et diarrhéiques, révèlent les signes manifestes d'une entérite subaiguë. Le cæcum est également plus ou moins diarrhéique. L'urine contient un peu d'albumine.

Le tableau bactériologique est intéressant : le sang, les or-



ganes et les cavités séreuses sont stériles, mais le contenu de l'intestin grêle — qui, chez les lapins normaux, est habituellement très pauvre en microbes — est ici transformé en une culture pure, très abondante, de *B. coli*.

A mesure qu'on diminue la dose du protéide, la survie des lapins augmente, tandis que les lésions de l'appareil digestif changent peu à peu de physionomie.

L'injection de 4 cultures solubilisées entraîne la mort des lapins au bout de 6 jours.

Dans ces cas, l'amaigrissement est plus accentué ; l'estomac est plus réduit de capacité et contient plus de liquide muqueux ; les parois de l'intestin paraissent plus flasques, plus atrophiées, plus remplies de mucosités et de détritux épithéliaux formant une espèce de crème extraordinairement riche en *B. coli*. L'urine est toujours albumineuse.

En injectant 3 cultures solubilisées, la mort arrive au bout de 8 jours. A cette période, l'amaigrissement est très accentué et tout l'appareil digestif présente les signes d'une véritable *cachexie intestinale* : pâleur presque cendrée de toutes les anses, des parois amincies, atrophiées, flasques, paralytiques, rendues presque transparentes, avec un contenu fluide et trouble, transformé en une culture pure de colibacilles. L'estomac présente encore un faible contenu alimentaire semi-liquide à réaction fortement acide. L'urine est albumineuse.

En diminuant encore la dose et en la réduisant à 2 cultures dissoutes seulement, le lapin, après un amaigrissement et un arrêt de poids qui dure plusieurs semaines, survit généralement.

Mais un lapin qui a reçu cette même dose, le 30 avril, est mort le 19 juillet, c'est-à-dire au bout de 81 jours. A l'autopsie, il présentait les signes d'une véritable *cachexie gastro-intestinale* : estomac très réduit de capacité avec un contenu fluide de réaction acide ; parois entériques incolores, paralytiques, extraordinairement amincies et presque transparentes, avec un contenu fluide, grisâtre, très riche en *B. coli*, urines albumineuses.

L'intérêt de ce cas a augmenté du fait que les cultures du sang et de la bile ont démontré la présence du *B. coli*. Du

contenu intestinal, transformé en une culture pure de colibacilles, une invasion colibacillaire s'était déchaînée!

En résumé, chez les lapins aussi, le protéide du vibron cholérique, absorbé lentement par le péritoine ou injecté dans les veines, finit par agir sur les parois du tube digestif. Même quand l'insuffisance de la dose ne provoque pas d'effets rapidement mortels, l'animal tombe certainement et gravement malade de gastro-entérite. Celle-ci, de l'état aigu, passe à l'état chronique jusqu'à produire une véritable cachexie intestinale qui, tôt ou tard, tue le lapin, non pas tant par intoxication lente que par la dénutrition progressive, causée par l'incapacité fonctionnelle de l'appareil digestif déjà abîmé par le poison protéique.

Dans les cas chroniques, le tableau peut finir par une invasion du *B. coli*.

Ce microbe, dans l'intestin grêle des lapins normaux, est, d'ordinaire, très faiblement représenté. L'ensemencement d'une anse normale de contenu entérique de lapin sain ne donne pas naissance à plus d'une ou de deux colonies de *B. coli*. La même quantité de matériel, prélevée du contenu intestinal d'un lapin mort d'entérite chronique, au contraire, donne naissance à un nombre de colonies de *B. coli* qui varie de 5.000 à 6.000!

Cette prodigieuse multiplication est due aussi à l'altération de la fonction sécrétive des parois intestinales.

On sait que, quoique dépourvue d'un véritable pouvoir bactéricide, la sécrétion entérique normale du lapin constitue cependant un mauvais moyen de culture pour tous les microbes (1).

Mais, lorsque les parois intestinales sont atteintes, elles se desquament et souffrent, par suite d'altérations fonctionnelles, toute la masse fluide du détritüs cellulaire qui en forme le contenu se transforme en une culture de *B. coli*.

Dans de telles conditions, l'invasion du *B. coli* dans le sang et dans les tissus peut se produire assez facilement.

(1) WOLLMANN, Action de l'intestin grêle sur les microbes. Ces *Annales*, 1910, p. 807.

## III

Le protéide du vibron cholérique n'exerce qu'« a tergo »  
une action toxique élective sur la muqueuse digestive

De l'ensemble de ces expériences il résulte nettement que le protéide du vibron cholérique n'agit énergiquement que lorsqu'on l'introduit aussitôt dans la circulation générale.

Dans ce cas, son action se manifeste, d'une façon élective et violente, sur les parois du canal digestif en produisant, spécialement chez les cobayes, une gastro-entérite aiguë, desquamative, accompagnée de faits congestifs généraux, d'œdèmes localisés, de météorisme et de sensibilité abdominale, d'hypothermie et de collapsus.

La dose mortelle de vibrions dissous, injectée dans les veines, correspond à peu près à la dose mortelle d'une culture vivante injectée dans la cavité péritonéale.

Ainsi, en employant des cobayes d'un poids moindre (290 grammes), avec l'injection endoveineuse d'une culture solubilisée tout entière, on obtient la mort en 5-6 heures.

Les altérations anatomiques que l'on trouve à l'autopsie sont d'autant plus graves que la quantité du protéide injecté a été plus élevée et que, par conséquent, l'évolution du processus toxique a été plus rapide.

Le tableau général de cette intoxication ne diffère pas fondamentalement de celui d'autres processus toxiques produits par des endotoxines bactériennes, mais les très graves lésions produites, surtout dans la muqueuse gastro-intestinale, prouvent que le poison du vibron cholérique agit sur cette muqueuse : soit que celle-ci présente une sensibilité particulière envers l'action du protéide, soit que — ce qui paraît plus probable — l'élimination du protéide par l'organisme s'effectue par l'émonctoire intestinal.

On sait d'ailleurs que la muqueuse intestinale constitue une surface d'excrétion, à travers laquelle l'organisme élimine beaucoup de substances qui ne prennent pas part à la crase sanguine et qui pourraient, d'une façon ou de l'autre, nuire à l'économie.

Nombreux sont les remèdes qui s'éliminent par l'intestin,



même s'ils ont été introduits dans l'organisme par voie parentérale. Exemples classiques, bien connus de tous les pharmacologistes : le mercure, le plomb, le cuivre, l'arsenic, le manganèse, le fer, le calcium, le bismuth, l'acide oxalique, le glucose, l'urée, etc.

La même chose se produit pour les alcaloïdes. La morphine, injectée sous la peau, est éliminée par la voie intestinale, dans la proportion de 60-70 p. 100. Langer (1) a démontré que la curarine, la toxine diphthérique et les éthéro-albumines s'éliminent à travers la muqueuse intestinale. Luciani (2) affirme que la plus grande partie de l'azote fécal est représentée, non par des substances protéiques inabsorbées, mais par des matières protéiques expulsées par la même muqueuse intestinale.

Pour les poisons microbiens, les travaux de Charrin (3) ont démontré depuis longtemps que les produits toxiques du bacille pyocyanique n'agissent qu'à travers la circulation générale, en produisant de graves altérations sur la muqueuse intestinale ; j'ai moi-même (4) signalé les mêmes effets relativement à la toxine typhique ; Denys et Van den Bergh (5) ont observé le même phénomène avec les produits toxiques du *B. coli*.

En ce qui concerne les microbes vivants, Pernice et Scagliosi (6) ont démontré, dès 1892, que le staphylocoque doré, le bacille du charbon, le *Bacillus prodigiosus*, le bacille pyocyanique et le *Bacillus subtilis*, inoculés sous la peau des animaux, s'éliminent régulièrement et abondamment, non seulement par la bile, l'urine, les séreuses, etc., mais aussi à travers la muqueuse intestinale.

Une thèse récente de Richet fils (7) a résumé et développé à fond ces vues, en étendant les expériences à d'autres espèces microbiennes et en en tirant des déductions pathogénétiques extrêmement importantes.

(1) Die Ableitung auf den Darm in Lichte moderner pathologischer Vorstellung. *Zeitschr. für experiment. Path. und Therap.*, 1906, p. 691.

(2) *Fisiologia del l'Uomo*. Torino, 4<sup>e</sup> édit., 2, chap. vi.

(3) La maladie pyocyanique. Paris, 1889.

(4) Etudes sur la fièvre typhoïde expérimentale. *Ces Annales*, 1892-1894.

(5) Sur le mécanisme des symptômes gastro-intestinaux dans le choléra nostras. *Bull. de l'Acad. royale de Méd. de Belgique*, 1893.

(6) Sulla eliminazione dei batteri dell'organismo. *La Riforma medica*, 1892, 2, p. 254.

(7) Etude clinique et expérimentale des entérites. Paris, 1912.

En conclusion, non seulement la surface intestinale élimine régulièrement des poisons inorganiques et organiques, des microbes, des protéines et des toxines, mais certains poisons, qui se montrent absolument inactifs quand ils sont mis en contact direct avec la surface muqueuse des voies digestives, deviennent délétères, en produisant des effets phlogistiques, de la diarrhée, des destructions épithéliales, des ulcérations et des eschares, quand ils pénètrent dans le sang et atteignent les muqueuses indirectement, c'est-à-dire à revers.

Tel est précisément le cas du protéide du vibrion cholérique qui, évidemment, n'agit sur l'intestin que quand il réussit à pénétrer dans la circulation générale.

Quant au mécanisme probable de cette élimination intestinale; nous sommes aujourd'hui bien éclairés grâce aux recherches expérimentales de Stassano (1).

Cet auteur a démontré en effet que la diapédèse des leucocytes à travers la muqueuse, et plus spécialement la muqueuse digestive, est un des principaux mécanismes par lesquels l'économie se débarrasse des principes qui lui sont nuisibles ou simplement inutiles.

Dans ce cas, les leucocytes fixent les substances, même solubles, avec lesquelles ils sont mis en contact, puis se dirigent vers l'intestin à travers lequel ils se déchargent, corps et biens !

C'est de cette façon que se produit l'élimination intestinale des sels de mercure, de manganèse, d'arsenic, etc., de la peptone, de la morphine, de la strychnine, de la ricine, etc. (2).

Tout fait donc croire qu'un mécanisme analogue règle l'élimination intestinale des poisons microbiens et des bactéries elles-mêmes.

Ces notions nous mettent en état de mieux comprendre aussi le mode d'action des cultures cholériques tuées, quand on les injecte dans le péritoine.

Au début de ces recherches, j'ai fait allusion aux nom-

(1) Sur le rôle des leucocytes dans l'élimination. *C. R. Acad. des Sciences*, 1901, **133**, p. 110.

(2) J. CARLES, Du rôle des leucocytes dans l'absorption et l'élimination des substances étrangères à l'organisme. Paris, Vigot édit., 1904, p. 133.

breuses discussions doctrinales provoquées par le fait que, pour tuer les cobayes avec des cultures vibrionniennes mortes, il faut des doses multiples de celle qui suffit quand on emploie des vibrions vivants.

On sait que, selon la thèse de Pfeiffer (1), le « poison cholérique » contenu dans le corps bacillaire, vivant ou mort, une fois mis en liberté par l'action bactériolytique de la lymphe péritonéale, puis réabsorbé, agirait presque exclusivement sur les centres de la circulation et de la thermogénèse.

Mais, comme cette conception obligerait à admettre qu'il est absolument indifférent d'injecter dans le péritoine des cobayes la même dose de culture vivante ou de culture morte, Pfeiffer, pour expliquer la nécessité d'augmenter la dose des vibrions morts, suppose que les vibrions vivants, dans un *premier temps*, se multiplient et que, par conséquent, il faut ce *surplus* de corps bacillaires (2).

Après ce que nous avons vu et dit à propos des précédentes expériences, il faut entendre la chose d'une façon bien différente.

Le protéide du vibron cholérique n'agit pas directement sur les centres circulatoires ou thermogénétiques, mais sur les parois intestinales.

Lorsque, au lieu de l'introduire dans la cavité péritonéale, on injecte le protéide dans les veines, la dose minima mortelle requise n'est plus un multiple, mais correspond à peu près à celle d'une culture vivante.

Par conséquent, si l'injection péritonéale de vibrions morts exige des doses plus fortes, cela est dû à ce que l'absorption du protéide à travers la séreuse abdominale des cobayes s'effectue, comme on l'a vu, à cause de l'action protectrice ou antitoxique de l'épiploon, d'une façon plus lente, plus difficile et peut-être même incomplète.

En effet, pour faire mourir en douze à seize heures un cobaye d'environ 300 grammes, avec des vibrions de l'Isonzo tués, il faut une dose 6 fois plus forte : c'est-à-dire il faut 6 cultures tuées à 56°.

(1) Studien zur Choleraätiologie. *Zeitsch. für Hygiene*, 1894, **16**, p. 268.

(2) *Ibidem*, p. 270.



Le tableau anatomique que l'on observe, dans ce cas, est parfaitement analogue à celui que l'on obtient par l'injection endoveineuse d'une seule culture solubilisée.

Ce tableau anatomique est très intéressant.

La cavité abdominale est remplie de transsudat citrin, où l'on voit toutefois des quantités innombrables de vibrions plus ou moins déformés et gonflés, peu colorables. On y remarque une absence complète d'éléments cellulaires. Les anses intestinales sont rougies, injectées et enflammées. Mais ce qu'il y a de plus important, c'est l'examen du mésentère. On y voit les vaisseaux lymphatiques satellites, à côté des artérioles capillaires, énormément gonflés et presque œdémateux. L'œdème est ensuite tout à fait imposant au niveau de la flexion duodénale, dans la membrane mésentérique qui soutient les acini de la glande pancréatique. Ceux-ci semblent immergés et enveloppés dans une haute couche de tissu gélatineux, transparent. Cette lésion qui est constante et identique, comme on l'a vu plus haut, même dans les cobayes qui meurent à la suite de l'injection endoveineuse de protéide, prend presque un caractère spécifique.

L'intestin grêle contient des mucosités riches en éléments épithéliaux desquamés.

En somme, les lésions de l'appareil digestif sont à peu près égales à celles que l'on observe non seulement après l'injection endoveineuse de cultures solubilisées, mais aussi après l'injection péritonéale de vibrions vivants.

Cela démontre, encore une fois, que le protéide du vibron cholérique, même s'il est introduit dans le péritoine, n'agit et ne tue que parce que, après avoir été absorbé dans la mesure voulue, il réussit, à travers la circulation, à agir *a tergo*, en atteignant à revers la muqueuse intestinale.

Les expériences que j'ai faites sur les lapins mènent aussi à des conclusions et à des considérations identiques. Même si on l'injecte dans le péritoine, le protéide du vibron cholérique agit *a tergo* sur les parois du canal digestif, c'est-à-dire à travers la circulation générale, en déterminant, selon la dose employée, des gastro-entérites aiguës, subaiguës et chroniques qui, à une échéance plus ou moins longue, aboutissent presque toujours à la mort de l'animal.

De tout ce qui précède on peut donc tirer les conclusions suivantes :

1° Le poison des vibrions cholériques est représenté par le protéide du même corps bactérien ;

2° On peut rendre libre ce protéide, en faisant agir sur les cultures vibrioniennes, tuées avec du toluène, en milieu légèrement alcalin, une faible solution de pancréatine. Celle-ci, en dissolvant l'enveloppe seulement des bactéries, en laisse intact, avec toutes ses propriétés antigènes et toxiques, le contenu, c'est-à-dire le protéide qui reste dissous dans le liquide, à l'état colloïdal.

3° L'absorption péritonéale, tant du protéide que des cultures vibrioniennes simplement tuées par la chaleur, s'effectue, chez les cobayes, d'une façon imparfaite. Il s'ensuit que les doses minima mortelles des cultures tuées, introduites par la voie du péritoine, doivent atteindre toujours un multiple de la dose minima mortelle d'une culture vivante.

4° Le protéide du vibron cholérique ne manifeste, chez les cobayes, de pouvoir toxique immédiat que lorsqu'il est introduit directement dans la circulation du sang. Dans ce cas, la dose minima mortelle correspond à celle des cultures vivantes et son action toxique ne s'exerce pas directement sur les centres nerveux, comme certains auteurs l'ont affirmé, mais atteint, *a tergo*, la muqueuse du canal digestif, en produisant une gastro-entérite aiguë, mortelle.

5° Les lésions produites sur la muqueuse intestinale des cobayes par le protéide du vibron cholérique injecté dans les veines sont absolument égales à celles que l'on observe après l'injection péritonéale d'une dose mortelle de vibrions, simplement tués par la chaleur.

6° Cela mène logiquement à se demander si la cause de la mort des cobayes qui succombent après l'injection péritonéale de cultures vivantes est à rechercher, non pas dans un processus inflammatoire du péritoine, comme on l'a cru jusqu'ici, mais plutôt dans l'effet des graves lésions produites par les vibrions ou par leur protéide sur les parois du tube digestif.

7° Chez les lapins, l'action toxique du protéide extrait des vibrions cholériques, même si on l'a injecté dans le péritoine, s'exerce électivement aux dépens du canal digestif, en produi-

sant, selon les doses employées, des gastro-entérites aiguës, subaiguës et chroniques, mortelles. Ces processus pariétaux, caractérisés par de très graves lésions anatomiques et fonctionnelles, sont accompagnés constamment d'une prodigieuse multiplication du *B. coli* intestinal et peuvent finir par une infection bacillaire générale.

8° L'action toxique exercée par le protéide des vibrions cholériques sur l'organisme des animaux de laboratoire, à part les graves altérations pariétales causées *a tergo* dans le canal digestif, ne reproduit aucun symptôme caractéristique qui rappelle, même de loin, le tableau de l'algidisme cholérique. Il reste donc douteux que l'on puisse appeler « poison cholérique » la substance qu'on extrait des cultures vibrioniennes.



# ACTION DU BACILLE FLUORESCENT LIQUÉFIANT DE FLÜGGE SUR L'ASPARAGINE EN MILIEU CHIMIQUEMENT DÉFINI

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

## PRODUITS ET MODE D'ATTAQUE DE L'ASPARAGINE

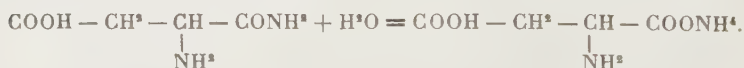
par le Dr A. BLANCHETIÈRE

(Travail du Laboratoire d'hygiène de Boulogne-sur-Mer.)

Dans un précédent mémoire j'ai montré (1) que le bacille étudié attaque l'asparagine en deux temps à chacun desquels correspond la mise en liberté d'un atome d'azote à l'état ammoniacal.

L'attaque de chacun de ces deux atomes d'azote se fait avec une vitesse nettement différente.

1° Phase d'hydrolyse du premier atome d'azote. — Le premier atome d'azote hydrolysé est l'atome amidé : il est séparé d'après la réaction étudiée d'abord par Arnaud et Charrin (2), de la manière suivante :



2° Phase d'hydrolyse du second atome d'azote. — Nous nous trouvons à ce moment en présence d'aspartate d'ammoniaque. L'hydrolyse continuant, c'est l'acide aspartique qui va être attaqué avec mise en liberté d'ammoniaque, pour la plus

(1) Ces *Annales*, juin 1917, 31, p. 291.

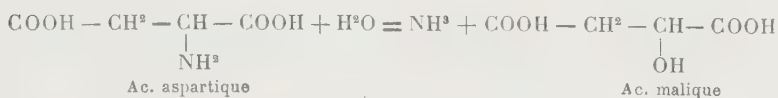
(2) *C. R. Acad. Sc.*, 1894, 112, p. 753 et 1157.

grande partie, sinon pour la totalité, puisque l'étude quantitative a démontré qu'à un moment donné 4/5 de l'azote aminé se retrouvent à l'état ammoniacal.

L'hydrolyse bactérienne de l'acide aspartique a déjà été étudiée par divers auteurs. Parmi ceux-ci je citerai : Ackermann (1), Borchardt (2), Brasch (3), Neubauer et Cappezzuoli (4), F. Ehrlich (5), etc...

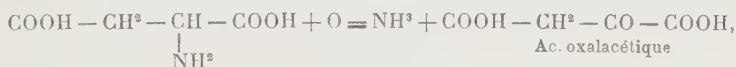
Les principaux types de transformation sont les suivants :

*a) Hydratation.* — Dans le cas présent, elle aboutit à la formation d'acide malique :

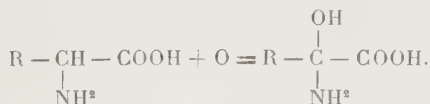


et serait l'équivalent de l'action de l'acide nitreux. On sait qu'à la suite des travaux de Neubauer et de ses collaborateurs on n'admet plus guère aujourd'hui cette transformation directe de l'acide aspartique en hydroxyacide.

*b) Oxydation.* — Par oxydation l' $\alpha$ -aminoacide serait transformé en acide  $\alpha$ -cétonique



ceci par l'intermédiaire d'un hydrate d'imino-acide :



(1) D. ACKERMANN, Ueber das  $\beta$ -Alanin als bakterielles Aporrhagma. *Zeits. Biol.*, 1911, **56**, p. 104.

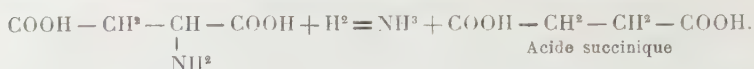
(2) L. BORCHARDT, Fäulnisversuche mit Glutamin- und Asparaginsäure, *Zeits. Phys. Chem.*, 1909, **59**, p. 96.

(3) W. BRASCH, Weitere Untersuchungen über den bakteriellen Abbau primärer Eiweisspaltprodukte. *Biochem. Zeits.*, 1909, **22**, p. 403.

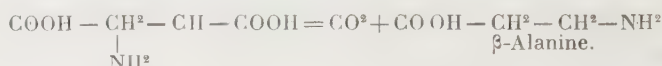
(4) NEUBAUER et CAPPEZZUOLI, Biochemische Umwandlung von Asparagin und Asparaginsäure in Propionsäure und Bernsteinsäure. *Biochem. Zeits.*, 1909, **18**, p. 424.

(5) EHRLICH, Ueber die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung. *Biochem. Zeits.*, 1909, **18**, 391, p. 423.

c) *Réduction*. — Elle conduit à la mise en liberté d'ammoniaque avec formation de l'acide saturé correspondant :



d) *Décarboxylation*. — Le carboxyle voisin de l'atome de carbone substitué est assez facilement attaqué dans certains cas avec production de  $\text{CO}^2$  et d'un acide  $\omega$ -aminé.



En somme, dans les premiers stades de l'attaque de l'acide aspartique nous aurons à rechercher la présence des corps suivants :

$\beta$ -Alanine  
Acide oxalacétique  
Acide malique  
Acide succinique  
Acide fumarique;

la présence de ce dernier ayant été signalée par Emmerling et Reiser (1), nous aurons donc, si nous le découvrons, à rechercher son mode de formation.

### TECHNIQUE

Toutes les recherches ont été faites sur le milieu suivant dans lequel les substances minérales resteront invariables et, seule, la substance fermentescible pourra varier suivant les besoins :

NaCl pur. . . . .	5 gr.
$\text{PO}^4\text{HNa}^3$ crist. . . . .	1 gr.
$\text{PO}^4\text{HK}^2$ crist. . . . .	1 gr.
Substance fermentescible . . . . .	5 gr.
Eau distillée q.s. pour . . . . .	1000 c.c.

Les cultures ont été effectuées à 20-22°.

Après des temps variables les milieux étaient soumis à l'analyse après centrifugation pour séparer les corps microbiens.

(1) EMMERLING et REISER. *Ber. d. deut. chem. Gesel.*, 1902, 35, p. 700.



La méthode d'analyse employée fut dans ses grandes lignes celle indiquée par Grimbert (1). L'expérience me prouva qu'on ne rencontre en quantité pondérable que deux produits volatils :

L'ammoniaque  
L'acide acétique

et des produits fixes variables avec la nature de la substance fermentescible; aussi me paraît-il indispensable de préciser certains détails de technique touchant l'extraction et la caractérisation des produits indiqués plus haut, comme pouvant être formés dans le métabolisme intermédiaire de l'acide aspartique.

1° **Extraction des acides fixes.** — Cette extraction est dominée par le fait qu'on a fréquemment des acides à fonction complexe, acides à fonction alcoolique ou cétonique, qui peuvent subir l'oxydation avec une extrême facilité.

D'autre part, un certain nombre d'acides considérés comme fixes ne le sont point d'une façon absolue; ils peuvent être, en particulier, parfaitement entraînaables par la vapeur d'eau à température relativement peu élevée. Je citerai les exemples de l'acide lactique dont l'entraînement par la vapeur d'eau à la température du bain-marie a été bien mise en évidence par Wolf (2) et de l'acide succinique (3) même en solution alcaline. Toutefois, dans ce dernier cas, l'entraînement est peu considérable.

M'inspirant de ces deux ordres de considérations, voici à quelle technique j'ai eu recours :

On évapore le milieu de culture alcalin tout d'abord au bain-marie jusqu'aux 9/10 de son volume environ. On filtre, on ajoute HCl en excès et on achève la dessiccation dans le vide.

Lorsque le résidu est bien sec et bien privé de HCl, on le redissout dans le minimum d'eau distillée et on l'évapore de nouveau dans le vide en présence d'un excès de sable lavé aux acides et calciné.

(1) GRIMBERT, Diagnostic des bactéries par leurs fonctions biochimiques. *Thèse de médecine*, Paris, 1903, p. 50 et suiv.

(2) WOLF. *The Journ. of Physiol.*, 1914, **48**, p. 342.

(3) EGERTON, CHARLES GREY, The estimation of succinic acid. *Biochem. Journ.*, 1917, **11**, p. 134 et *Bull. Soc. Chim.*, 1917 [4], **21**, p. 136.

J'insiste sur l'utilité de concentrer dans le vide après mise en liberté des acides organiques par HCl et ceci pour les deux raisons indiquées précédemment.

En opérant à la température du bain-marie on peut avoir entraînement de certains acides, par exemple les acides lactique et succinique.

A la température de 100° l'action oxydante de l'air en présence de HCl est loin d'être négligeable, ce qui a son importance si on recherche de petites quantités d'acides.

J'insiste également sur la nécessité d'éliminer l'excès de HCl avant d'ajouter le sable, sans quoi, aux dépens de ce dernier il y a formation de traces de chlorure ferrique, qui jouit d'un pouvoir oxydant certain vis-à-vis des acides-alcools, d'où disparition possible de ces derniers et plus certainement encore des acides à fonction cétonique.

Quoi qu'il en soit, la substance, ainsi évaporée sur sable, est pulvérisée, placée dans une douille de Soxhlet et épuisée à l'éther anhydre. A la fin de l'opération l'éther est distillé, le résidu séché dans une capsule tarée. On a ainsi le poids des acides fixes.

Cette technique étant indiquée une fois pour toutes, on saura ce que veulent dire les mots : « ce produit a été rencontré parmi les acides fixes ».

2° Séparation des acides fixes. — Les acides fixes que nous pouvons espérer rencontrer (malique, succinique, fumarique) ou leurs produits fixes de dégradation les plus fréquents (acides malonique, oxalique, lactique) peuvent être séparés en se basant sur l'insolubilité de leur sel de baryum dans l'alcool à 75 centièmes, ainsi que l'a indiqué Mestrezat (1). Aux acides indiqués par cet auteur, il convient d'ajouter les acides fumarique et maléique dont les sels de baryum sont également insolubles dans ces conditions.

Dans le liquide filtré, on peut s'assurer par des réactions appropriées de l'absence du lactate de baryum en opérant de la façon suivante :

Les acides fixes, extraits comme il a été indiqué plus haut,

(1) MESTREZAT. *C. R. Acad. Sc.*, 1906, **143**, p. 185.

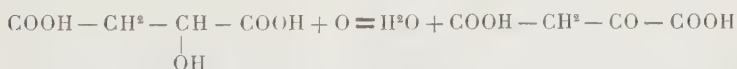
sont dissous dans le minimum d'eau distillée, neutralisés exactement par  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . Le tout est additionné d'une quantité d'alcool telle que le titre alcoolique de la liqueur soit de 75 centièmes, on abandonne quarante-huit heures au frais, on essore et on lave le précipité sur un Büchner avec de l'alcool à 75 centièmes.

3° **Caractérisation des acides fixes.** — *Acide tartrique.* — Le précipité redissous dans le minimum d'eau est additionné d'un peu de chlorure ou d'acétate de potassium, d'acide acétique et d'alcool; l'absence d'un précipité de crème de tartre (très peu soluble dans le liquide alcoolique) démontre l'absence d'acide tartrique.

*Acide malique.* — La solution des acides fixes donne la réaction type d'Uffelmann : virage au jaune serin de la solution violette.

Traitée par un excès de permanganate de potasse à chaud elle fournit un dégagement d'aldéhyde qu'on met en évidence au moyen d'une baguette trempée dans le réactif de Nessler. Elle donne la réaction de Piñerua avec le  $\beta$ -naphtol sulfurique (1).

Enfin l'oxydation ménagée par le permanganate en présence d'acétate mercurique permet d'obtenir nettement la réaction de Denigès (2). Cet auteur a montré, en effet, que dans ces conditions l'acide malique est oxydé en acide oxalacétique,



et que ce dernier s'unit immédiatement au mercure en fournissant une combinaison extrêmement insoluble qui soustrait l'acide oxalacétique à l'action oxydante ultérieure du permanganate.

Cette réaction est spécifique.

Dans le cas présent il se produit toujours au début de l'oxydation quelques flocons bruns de sel ferrique, dissous malgré

(1) PIÑERUA. *C. R. Acad. Sc.*, 1897, **124**, p. 291.

(2) DENIGÈS. *C. R. Acad. Sc.*, 1900, **130**, p. 320, et *Précis de Chimie analytique*, 4<sup>e</sup> édition, p. 250 (Paris, 1913, Maloine).

tout par les acides organiques aux dépens du sable; c'est probablement de l'acétate basique de fer. Une addition ultérieure de permanganate fait apparaître le précipité mercuriel blanc et lourd qui se dépose facilement.

*Acide fumarique.* — La séparation et la caractérisation de l'acide fumarique sont basées sur sa faible solubilité qui est de 1 pour 200 parties d'eau froide environ (1), tandis que la solubilité des autres acides qu'on peut rencontrer est beaucoup plus considérable :

Acide succinique . . . . .	5 p. 100 environ.
Acide malique . . . . .	Très soluble déliquescent.
Acide tartrique . . . . .	132 p. 100 environ.
Acide malonique . . . . .	100 — —
Acide oxalique . . . . .	10 — —

Cette très faible solubilité permet de le séparer facilement ; au besoin on achève sa purification par cristallisation dans l'éther.

A. CARACTÉRISATION A L'ÉTAT D'ACIDE FUMARIQUE. — Donne de bons résultats lorsqu'on dispose d'une certaine quantité de produits : elle comprend deux déterminations.

a) Titrage alcalimétrique sur un poids connu de substance qui permet de voir si le poids moléculaire de l'acide correspond à celui de l'acide fumarique. Cette détermination est aisée à chaud en face de phtaléine et ne permet guère de confusion qu'avec l'acide succinique.

b) Mise en évidence d'une fonction éthylénique par absorption du brome. Cette absorption, qui se fait facilement au bain d'eau bouillante avec de l'eau de brome, conduit à l'acide dibromosuccinique qu'on peut caractériser, en sa qualité d'éther tartrique par condensation, avec la résorcine en milieu sulfurique comme l'a indiqué Denigès (2).

Les deux déterminations précédentes me paraissent indispensables pour affirmer qu'on a bien affaire à l'acide fumarique, la seconde seule me paraît insuffisante.

B. CARACTÉRISATION A L'ÉTAT DE DÉRIVÉ MALÉIQUE. — Lorsqu'on

(1) Dictionnaire de Würtz.

(2) DENIGÈS. *Op. cit.*, p. 241.



ne dispose que de quantités d'acides insuffisantes pour procéder aux deux déterminations précédentes, on peut caractériser sûrement l'acide fumarique en le transformant en anhydride maléique qu'on peut combiner avec l'aniline pour obtenir le maléine-anilide très peu soluble dans l'eau, presque insoluble dans l'alcool froid d'après Michael (1).

a) *Transformation de l'acide fumarique en anhydride maléique.* — Pratiquement avec quelques centigrammes de matière, sans s'embarrasser d'anhydride phosphorique, de perchlorure ou d'oxychlorure de phosphore, on peut opérer de la façon suivante :

Choisir un tube de verre pénétrant aisément dans le canal d'un bloc de Maquenne, le fermer à un bout et le couper à une longueur telle que, l'extrémité fermée étant au milieu du canal, l'autre dépasse le bloc d'une dizaine de centimètres.

On porte le bloc, muni d'un thermomètre, à 250° environ, puis on y introduit le tube laboratoire dans le fond duquel on a placé quelques centigrammes de l'acide à déterminer; la transformation est rapide. Le produit condensé dans la partie froide du tube renferme l'anhydride.

Lorsqu'on juge la quantité suffisante on laisse refroidir, on étire le tube et on le ferme au-dessous de l'anneau de cristaux distillés, on humecte avec de l'aniline et on porte à l'étuve à 110°.

b) *Formation et purification du maléine-anilide.* — Après quelques heures, trois ou quatre suffisent, le tube retiré de l'étuve est refroidi, et la substance qu'il renferme délayée dans de l'alcool à 90 centièmes en s'aidant d'un fil de platine rigide. La substance, résistante au début, finit toujours par se dissocier.

On la lave à l'alcool, qui en extrait un corps dont la coloration varie du rose au brun et qui, en tout cas, brunit rapidement à l'air et à la lumière. Le mieux est d'effectuer ces lavages dans un tube de centrifugeuse. A la fin on doit avoir une poudre microcristalline blanche.

c) *Caractérisation du maléine-anilide.* — Sa formation après isomérisation caractérise l'acide fumarique et le distingue de

(1) MICHAEL. *Amer. chem. Soc.*, 9, p. 183.

l'acide maléique qui, lui, donne directement l'anilide par ébullition avec de l'aniline et de l'eau (Michael) (1).

Cet auteur prépare en effet le maléine-anilide par ébullition simple avec l'anhydride ou l'acide maléique additionnés de leur poids environ d'aniline, le tout dissous dans dix parties d'eau.

Au bout d'une heure au bain-marie bouillant on obtient de longues aiguilles soyeuses, qui, soigneusement lavées à l'alcool, fondent à 212-213° et présentent au microscope un aspect caractéristique que montre bien la microphotographie ci-dessous :



FIG. 1. — Micro-cristaux de maléine-anilide, obj. 3 ocul. 4 de Leitz.

J'attire tout particulièrement l'attention sur l'aspect pour ainsi dire cannelé de ces cristaux, qui est tout à fait typique.

Lorsqu'on disposera d'une quantité de substance suffisante il ne faut donc pas hésiter, au lieu d'opérer à sec, comme je l'ai indiqué ci-dessus, à préparer le maléine-anilide par ébullition aqueuse qui donne les cristaux les plus typiques.

Malheureusement je n'ai pu obtenir ainsi qu'un très mauvais rendement quelles que soient les conditions dans lesquelles j'ai opéré : augmentation de la quantité d'aniline, traitement sous pression, quantités d'eau variables, etc., le rendement n'a jamais dépassé 3 à 5 p. 100 de la théorie.

(1) MICHAEL. *Ber. d. deut. chem. Gesel.*, 19, p. 1873.

Au contraire, en chauffant à sec comme je l'ai montré, le rendement est toujours voisin de 35 p. 100 de la théorie, mais les microcristaux n'ont plus rien de caractéristique.

On peut arriver cependant à une bonne préparation en redissolvant la poudre dans l'eau bouillante et laissant cristalliser par refroidissement après filtration. Les nouveaux microcristaux obtenus, outre leur point de fusion, ont un aspect bien typique.

Le dosage de l'azote complète utilement la détermination. Si on a une quantité de substance suffisante, et celle-ci peut être très réduite en employant une des nombreuses micro-méthodes de détermination de l'azote qui ont vu le jour durant ces dernières années en Amérique, en Angleterre et en Allemagne.

Trois expériences ont fourni les résultats suivants :

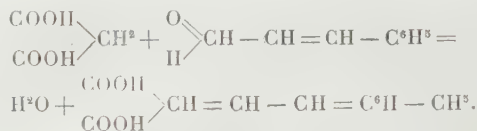
- I. — Poids de substance . . . . . 0 gr. 1126 (provenant d'acide fumarique pur) [contrôle].  
 Volume d'acide sulfurique  $\frac{N}{10}$  0,9765 saturé par l'ammoniaque produite : 8 c.c. 5.  
 Azote p. 100 trouvé . . . . . 10,31
- II. — Poids de substance . . . . . 0 gr. 1025 (provenant d'un produit de fermentation de l'asparagine).  
 Azote p. 100 trouvé . . . . . 10,47.
- III. — Poids de substance . . . . . 0,1068 (provenant de la fermentation de l'acide malique).  
 Volume d'acide sulfurique  $\frac{N}{10}$  1,036 saturé par l'ammoniaque produite : 7 c.c. 4.  
 Azote p. 100 trouvé . . . . . 10,38.  
 Volume d'acide sulfurique  $\frac{N}{10}$  1,036 saturé par l'ammoniaque produite : 14 c.c. 8.  
 Azote p. 100 du maléine-anilide. 10,52 (calculé).

Caractérisation de l'acide malonique. — J'ai employé la méthode si élégante et si précise indiquée par Bougault (1). Celle-ci est basée sur la facile condensation de l'acide malonique avec les aldéhydes. Riiber le premier (2) avait pensé à condenser l'acide malonique avec l'aldéhyde cinnamique en

(1) BOUGAULT, Recherche et caractérisation de l'acide malonique. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1913 [7], 8, p. 280.

(2) RIIBER. *Ber. d. deut. chem. Gesell.*, 1904, 37, p. 1883.

présence de pyridine. Bougault a préconisé la condensation de ces deux corps en présence d'acide acétique qui fournit vraiment d'excellents résultats. On n'a qu'à suivre à la lettre les indications données par cet auteur. Il y a formation d'acide cinnamylidène malonique.



Cet acide de couleur jaune soufre fond à 208°, il est très peu soluble dans l'eau et l'alcool faible, facilement soluble dans l'alcool fort. Il en cristallise par évaporation sous forme de longues aiguilles prismatiques très caractéristiques, ce sont des prismes obliques. La microphotographie ci-contre montrera mieux leur aspect que toute description :

Recherche et caractérisation de la  $\beta$ -alanine. — Je me suis basé sur le fait signalé par Ackermann (1) que les  $\omega$ -amino-acides sont précipités en liqueur étendue par l'acide phosphotungstique tandis que les  $\alpha$ -amino-acides ne le sont pas.

Le milieu de culture est privé d'ammoniaque par déplacement de celle-ci au moyen de la magnésie, suivi d'une extraction par un violent courant d'air, comme dans le dosage de l'ammoniaque par le procédé Folin. Lorsque la totalité de l'ammoniaque a été éliminée, ce dont on s'assure par barbotage du gaz dans du réactif de Nessler, le liquide est filtré et précipité par l'acide phosphotungstique. Le précipité est recueilli après vingt-quatre heures, lavé par centrifugation au moyen de  $\text{SO}^4\text{H}^2$  à 5 p. 100, puis d'alcool. Le phosphotungstate est décomposé au moyen d'hydrate de plomb, le liquide filtré est privé de plomb par  $\text{H}^2\text{S}$ , l'excès de  $\text{H}^2\text{S}$  éliminé par un courant d'air; le liquide, filtré de nouveau, est concentré dans le vide. Le corps peut être caractérisé à l'état de chloroplatinate  $(\text{C}^3\text{H}^7\text{O}^2\text{N})^2\text{PtCl}^6$  fondant à 180° et dans lequel on peut

(1) D. ACKERMANN, Ueber das  $\beta$ -Alanin als bakteriellcs Aporrhagma. *Zeits. Biol.*, 1911-1, 56, p. 87-90.



doser Pt, Cl et N, ou de sel de cuivre  $(C^3H^4O^2N)^2Cu, 6H^2O$  dont on n'a qu'à doser l'eau de cristallisation et dans lequel on peut doser également Cu et N.

Si on ne possède que des traces du corps le meilleur procédé de caractérisation est celui de Abderhalden et Fodor (1) basé

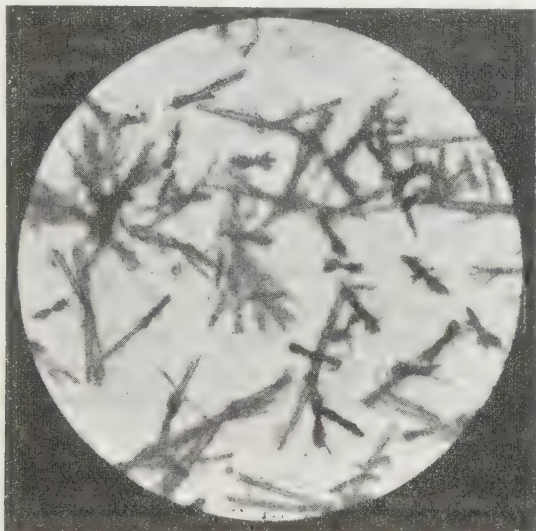


FIG. 2. — Microcristaux d'acide cinnamylidène malonique.  
(Obj. 3 ocul. 4 de Leitz.)

sur la transformation de l'éther éthylique de la  $\beta$ -alanine en éther acrylique sous l'action de la chaleur :



L'odeur piquante de l'éther acrylique permet de le reconnaître aisément.

Caractérisation des acides volatils. — Leur détermination a été faite d'abord par la méthode classique de Duclaux, et leur nature confirmée par les réactions qui leur sont propres.

(1) ABDERHALDEN et FODOR, Versuche über die bei der Fäulnis von l. Asparaginsäure entstehenden Abbaustufen. Eine neue Methode zum Nachweis von  $\beta$ -Alanin. *Zeits. Phys. Chim.*, 1913, 65, p. 112, 130.

L'acide acétique, déterminé par la méthode de Duclaux, fut caractérisé par la formation de cacodyle et la transformation d'un poids connu du sel de chaux en carbonate.

Voici les chiffres d'une des déterminations effectuées :

FRACTIONS cent. cubes	CENT. CUBES D'EAU de chaux par fraction	CENT. CUBES D'EAU de chaux pour la totalité des fractions passées à la distillation	POURCENTAGE de l'acide passé à la distillation	POURCENTAGE pour l'acide acétique (Duclaux)
10	2,80	2,80	6,75	7,4
20	3,45	6,25	15,5	15,2
30	3,45	9,70	23,4	23,4
40	3,25	12,95	31,3	32,0
50	3,70	16,65	40,3	40,0
60	4,15	20,80	50,2	50,2
70	4,40	25,20	60,9	60,9
80	4,40	29,60	71,6	71,9
90	4,95	34,55	83,8	84,4
100	7,45	41,00	100,0	100,0

23 c.c. 2 de l'eau de chaux employée saturaient 10 cent. cubes d'acide chlorhydrique  $\frac{N}{10}$ .

Les acides volatils d'une autre fraction de la culture, saturés par du carbonate chaux, ont fourni à l'évaporation 0 gr. 3051 de sel de calcium. Ce sel redissous dans l'eau, le calcium, a été dosé par précipitation à l'état d'oxalate, suivie de transformation en carbonate.

Poids de carbonate trouvé : 0 gr. 1918

d'où le pourcentage d'acétate anhydre : 25,1, calculé 25,31.

## RÉSULTATS

La technique employée ayant été donnée avec les détails qui ont paru indispensables, il est possible d'exposer les résultats obtenus.

L'expérience a montré que les acides suivants sont produits en quantité appréciable dans l'attaque de l'asparagine par le *B. fluorescens* :

- A. Acide volatil : Acide acétique.
- B. Acides fixes { Acide malique.  
Acide succinique.  
Acide fumarique.
- C. Acide carbonique.

*L'acide malique*, qui peut toujours être mis en évidence pendant les premières semaines de la fermentation par la méthode Denigès, n'a jamais existé en quantité suffisante pour faire l'objet d'un dosage précis. Dans les phases ultimes de la fermentation il disparaît même complètement et ne peut plus être retrouvé à l'état de combinaison oxalacétomercurique.

*L'acide succinique* a augmenté jusqu'au trentième ou trente-cinquième jour de la culture. La quantité décroît ensuite, mais il en reste constamment des proportions notables, quelle que soit la durée de la culture, même lorsqu'on abandonne celle-ci jusqu'à la mort du microorganisme.

*L'acide fumarique* exige une mention spéciale. La quantité formée paraît être très différente suivant les races de *B. fluorescens* employées. Les premières souches que j'ai isolées en fournissaient si peu que, malgré la connaissance du travail d'Emmerling et Reiser, cité plus haut, j'ai méconnu la nature d'un très léger résidu peu soluble dans l'eau que je rencontrai dans mes analyses. Ce résidu était d'ailleurs si faible qu'il m'aurait fallu opérer sur des dizaines de litres de culture pour obtenir une quantité de substance suffisante pour la caractérisation. Postérieurement, j'ai rencontré des échantillons donnant des rendements appréciables en acide fumarique; mais, contrairement aux affirmations des auteurs précédents, je n'ai jamais eu entre les mains de races fournissant de l'acide fumarique à l'exclusion d'acide succinique.

*L'acide acétique*, dès le huitième jour, se trouve déjà en quantité appréciable, il passe également par un maximum, de la troisième à la quatrième semaine (il en a été trouvé 0 gr. 315 par litre de culture), diminue ensuite lentement et finit par disparaître presque complètement ou même complètement.

*L'acide carbonique* croît régulièrement du commencement à la fin de la fermentation. A partir de la quatrième à la cinquième semaine, le liquide de culture fait nettement effervescence aux acides.

La formation de l'acide malique précède bien celle de l'acide succinique car :

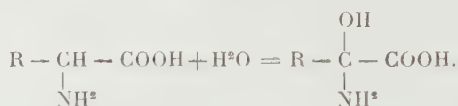
D'une part, lorsqu'on ensemence le *B. fluorescens* sur un milieu de culture analogue au précédent, mais dans lequel on

remplace l'asparagine par du malate d'ammoniaque, on constate la production d'acide succinique.

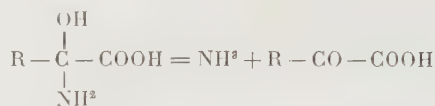
D'autre part, la même expérience, faite en remplaçant l'asparagine par du succinate d'ammoniaque, ne montre jamais la formation d'acide malique.

**Passage de l'asparagine à l'acide malique.** — Il est généralement admis depuis Knoop (1), Neubauer et K. Fromherz (2) que le passage de l'amino-acide à l'hydroxyacide comprend deux stades intermédiaires.

A) Par fixation d'un atome d'oxygène il y aurait tout d'abord production d'un hydrate d'imino-acide



B) Puis, par perte d'une molécule d'ammoniaque, formation de l'acide  $\alpha$ -cétonique



lequel, par réduction ultérieure, fournirait l' $\alpha$ -hydroxy-acide :



Comme je l'ai déjà indiqué brièvement ailleurs (3) la divergence des résultats obtenus par Emmerling et Reiser d'une part, par moi-même, d'autre part, me paraît renforcer, singulièrement, l'hypothèse de la formation transitoire de l'hydrate d'imino-acide.

En effet : les acides  $\alpha$ -cétoniques peuvent exister sous deux formes, la forme cétonique ordinaire



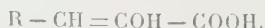
(1) KNOOP. *Zeits. f. Phys. Chem.*, 1911, **71**, p. 489.

(2) O. NEUBAUER et K. FROMHERZ. *Zeits. f. Phys. Chem.*, 1911, **70**, p. 326.

(3) BLANCHETIÈRE. *C. R. Acad. Sc.*, 1916, **163**, p. 206.



et la forme œnolique



La réduction de l'acide-cétone sous sa forme cétonique aboutit à l'acide-alcool correspondant :



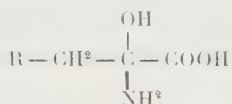
La réduction de l'acide sous sa forme œnolique aboutit au contraire à un acide non saturé



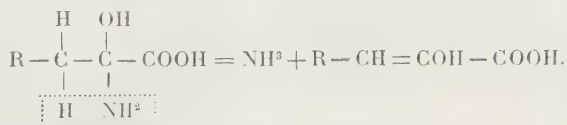
ainsi qu'il a été constaté par Emmerling et Reiser.

Il est évident que la formation transitoire de l'hydrate d'imino-acide explique ces faits le plus simplement possible :

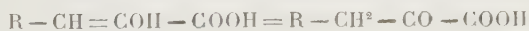
L'hydrate d'imino-acide



perdra une molécule d'ammoniaque non pas aux dépens des éléments du seul atome de carbone auquel est lié le groupe  $NH^2$ , mais aux dépens d'éléments appartenant aux deux atomes de carbone voisins  $\alpha$  et  $\beta$

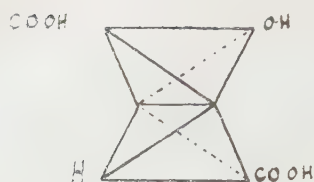


On tombera donc forcément sur l'acide-cétone sous sa forme œnolique instable, qui aura tendance à se transformer en forme cétonique :

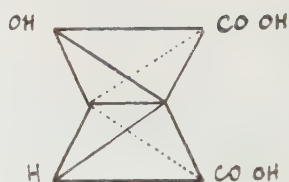


mais si le microorganisme considéré possède un ferment œnolisant, la forme œnolique deviendra stable, et le microbe pourra utiliser l'acide sous cette dernière forme.

Dans le cas actuel (acide oxalacétique), la forme œnolique existera sous deux variétés stéréoisomères :



Forme cis-trans (stable)  
isomère fumarique.

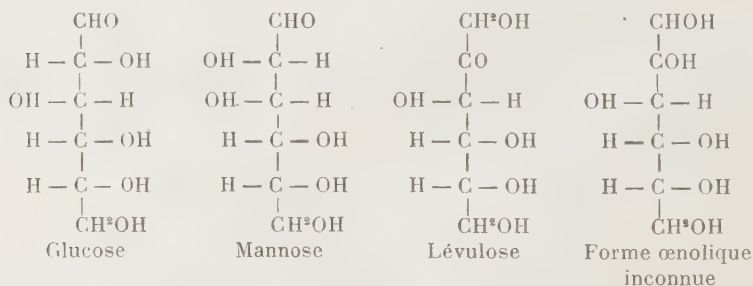


Forme cis (instable)  
isomère maléique.

dont la forme cis-trans, stable, conduira à l'acide fumarique découvert par Emmerling et Reiser.

On sait que l'existence des ferments œnolisants est admise pour expliquer les différences constatées dans l'action des levures sur les sucres (1).

Dans la série des sucres on a constaté, d'une part, que l'intégrité de la fonction aldéhyde ou cétone est indispensable pour que le corps puisse fermenter, ce qui a porté à penser que la forme œnolique commune aux sucres d'un même groupe :



est le stade intermédiaire indispensable de la fermentation.

D'autre part, on a constaté que, dans la série du galactose, ce sucre seul fermente alors que ses isomères, le talose et le tagatose (sucre cétonique), ne fermentent par aucune des levures connues. Cette anomalie s'expliquerait par le fait que les levures ne possèdent point de ferment œnolisant compatible avec la structure du talose et du tagatose.

Dans le cas du *B. fluorescens* il y aurait quelque chose

(1) E. FRANKLAND ARMSTRONG. *The simple carbohydrates and the glucosides* p. 52-54 (Londres, 1910, Longmans Green).

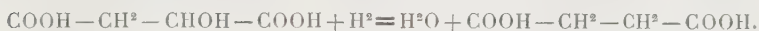
d'analogue, certaines races possédant, d'autres étant dépourvues de ferment œnolisant.

Passage de l'acide malique à l'acide succinique. — Comme je l'ai dit plus haut, le *B. fluorescens* pousse admirablement bien, en produisant son pigment, sur un milieu chimiquement défini où le malate d'ammoniaque est le seul corps fermentescible.

Sur ce milieu j'ai vu la production d'acide succinique dépasser 40 p. 100 du rendement théorique.

Comme l'acide succinique lui-même est attaqué par le *B. fluorescens*, on doit admettre qu'il est l'intermédiaire nécessaire du métabolisme de l'acide malique par ce microbe.

Rien ne permet de penser que la réaction puisse être autre qu'une fixation d'hydrogène sur l'acide malique avec élimination d'une molécule d'eau :



Passage de l'acide succinique à l'acide acétique. — Le bacille fluorescent-liquéfiant de Flüge pousse sur milieu chimiquement défini dans lequel le succinate d'ammoniaque représente la seule source de carbone et d'azote, mais sa croissance est extrêmement précaire et généralement, au bout de deux à quatre semaines, la culture n'est plus repiquable.

La recherche qualitative des acides fixes et volatils permet de déceler de petites quantités d'acide fumarique ainsi que de faibles quantités d'acide acétique.

L'acide fumarique est-il l'intermédiaire entre les acides succinique et acétique?

Pour résoudre cette question j'ai soumis à l'action du *B. fluorescens* du fumarate d'ammoniaque dans la solution minérale indiquée ci-dessus.

Comme avec le succinate, le développement du microorganisme se fait très mal et, chose paradoxale, une partie de l'acide fumarique se transforme en acide succinique alors que, par ailleurs, on trouve également de l'acide acétique. Il est à peine besoin de dire que j'ai repassé le microbe sur milieu solide et vérifié soigneusement son identité. Les circonstances

ne m'ont pas permis d'élucider ce point, que je me propose de reprendre.

La transformation de l'acide succinique en acide fumarique a été récemment signalée par Thunberg (1) au moment même où les présentes recherches étaient exécutées, mais le mémoire de Thunberg n'est parvenu à ma connaissance que dans les premiers mois de l'année 1917. Les expériences de cet auteur étaient assez peu faites d'ailleurs pour entraîner la conviction : il se basait sur la réduction du bleu de méthylène en présence de succinate de potasse et d'un extrait de tissu musculaire pour affirmer la déshydrogénation de l'acide avec production de l'acide fumarique.

Dans mes expériences j'ai pu obtenir une quantité d'acide fumarique suffisante pour l'identifier à l'état de maléine-anilide conformément à la technique exposée plus haut.

**Produits secondaires de l'attaque de l'asparagine.** — Par cette expression j'entends les produits qu'on n'obtient qu'en très faible quantité sans préjuger de l'importance de leur rôle en ce qui concerne le mécanisme de la dégradation de l'asparagine.

A) CORPS ALDÉHYDIQUES ET CÉTONIQUES. — Les milieux de culture n'ont jamais montré de pouvoir réducteur sensible sur le réactif cupropotassique, à froid ou à chaud, pas plus que sur le nitrate d'argent ammoniacal à froid.

Pas de réaction sensible non plus avec la fuchsine bisulfitée, le nitro-prussiate de soude ou la phénylhydrazine.

B) La recherche de la  $\beta$ -alanine est constamment restée négative.

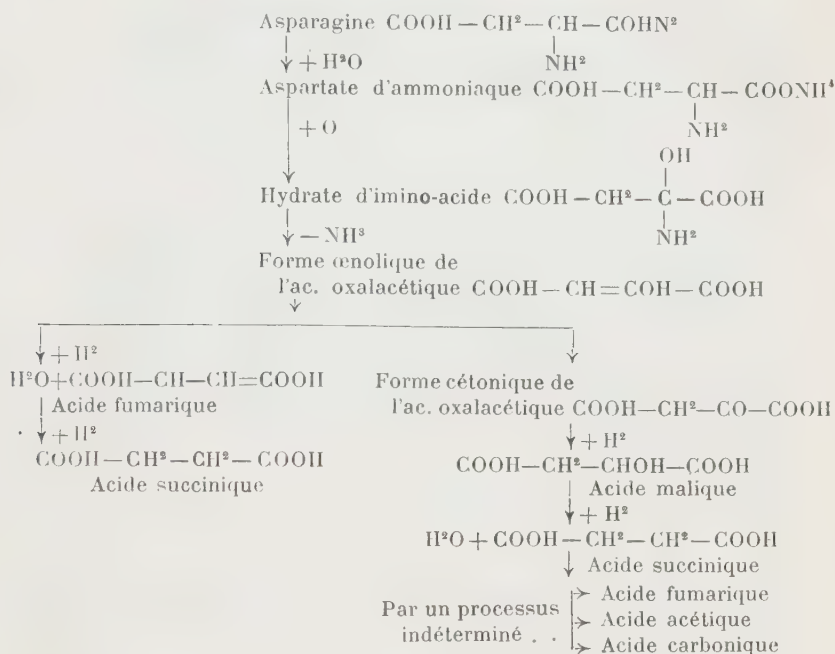
C) Par contre dans les premières semaines de la fermentation il a toujours été possible de mettre en évidence des traces d'acide malonique et plus tard des *traces* de cristaux très peu solubles dans l'eau qui ont pu être identifiés avec l'acide fumarique. Les quantités obtenues étaient trop faibles pour se prêter à un dosage précis.

En résumé, la dégradation de l'asparagine par le bacille

(1) R. THUNBERG. *Centr. Physiol.*, 1916, **31**, p. 91-93.



fluorescent liquéfiant de Flügge se ferait donc principalement suivant le schéma ci-dessous :



Bien entendu j'insiste sur l'expression « Dégradation de l'asparagine », car simultanément existe un processus de synthèse qu'il est beaucoup plus malaisé d'étudier et qu'il serait pourtant beaucoup plus intéressant de connaître. Chaque ballon d'un demi-litre de culture fournit en effet une quantité de corps bactériens pesant à l'état sec de 15 à 20 centigrammes et dans lesquels on peut mettre en évidence l'existence de graisses, d'acides compliqués, en particulier la tyrosine et le tryptophane, etc... dont le schéma précédent ne permet pas de prévoir la formation. Ce schéma ne doit donc se rapporter qu'à la fonction énergétique du microbe; sa fonction synthétique nous demeure complètement inconnue.

## LES VACCINATIONS ANTIRABIKUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1919

Par J. VIALA,

Préparateur au service antirabique.

Pendant l'année 1919, 1.815 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : 5 sont mortes de la rage, soit une proportion brute de 0,27 pour 100.

Une de ces personnes a été prise de rage au cours du traitement, une autre est morte de la rage moins de 15 jours après la fin du traitement, elles doivent être défalquées pour le calcul de la mortalité.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées . . . . .	1.813
Morts . . . . .	3
Mortalité p. 100 . . . . .	0,16

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1903	628	2	0,32
1887	2.770	14	0,79	1904	733	3	0,39
1888	1.622	9	0,55	1905	721	3	0,41
1889	1.830	7	0,38	1906	772	1	0,43
1890	1.540	5	0,32	1907	786	3	0,38
1891	1.559	4	0,25	1908	524	1	0,19
1892	1.790	4	0,22	1909	467	1	0,21
1893	1.648	6	0,36	1910	401	0	0,00
1894	1.387	7	0,50	1911	341	1	0,29
1895	1.320	5	0,38	1912	395	0	0,00
1896	1.308	4	0,30	1913	330	0	0,00
1897	1.329	6	0,39	1914	373	0	0,00
1898	1.465	3	0,20	1915	654	1	0,15
1899	1.614	4	0,25	1916	1.388	3	0,21
1900	1.420	4	0,28	1917	1.543	4	0,26
1901	1.321	5	0,38	1918	1.803	3	0,16
1902	1.005	2	0,18	1919	1.813	3	0,16

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories.

*Catégorie A.* — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

*Catégorie B.* — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

*Catégorie C.* — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1919.

ANNÉE 1919	MORSURES A LA TÊTE			MORSURES AUX MAINS			MORSURES AUX MEMBRES			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A.	8	1	1,25	95	0	0	128	0	0	231	1	0,43
Catégorie B.	110	0	0	521	0	0	289	1	0,33	920	1	0,10
Catégorie C.	53	1	1,88	430	0	0	179	0	0	662	1	0,15
	171	2	1,16	1.046	0	0	596	1	0,16	1.813	3	0,16

Les personnes se répartissent de la façon suivante, d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France. . . . .	1.777	Allemagne. . . . .	25
Italie. . . . .	2	Russie . . . . .	3
Belgique. . . . .	4	Espagne . . . . .	1
Luxembourg. . . . .	1		

Répartition par département des 1.777 personnes traitées mordues en France.

Aisne. . . . .	10	Charente-Inférieure. . . . .	4
Allier. . . . .	11	Cher . . . . .	38
Alsace . . . . .	6	Corrèze. . . . .	22
Ardennes. . . . .	13	Côte-d'Or. . . . .	7
Aube . . . . .	19	Côtes du-Nord . . . . .	45
Aveyron . . . . .	7	Creuse . . . . .	17
Calvados . . . . .	6	Deux-Sèvres . . . . .	5
Cantal . . . . .	19	Doubs . . . . .	8

Eure . . . . .	45	Nord . . . . .	3
Eure-et-Loir . . . . .	16	Oise . . . . .	26
Finistère . . . . .	34	Orne . . . . .	10
Ile-et-Vilaine . . . . .	18	Pas-de-Calais . . . . .	55
Indre . . . . .	11	Puy-de-Dôme . . . . .	16
Indre-et-Loire . . . . .	16	Pyrénées (Basses-) . . . . .	6
Loir-et-Cher . . . . .	18	Saône-et-Loire . . . . .	6
Loire (Haute-) . . . . .	15	Saône (Haute-) . . . . .	5
Loire-Inférieure . . . . .	40	Sarthe . . . . .	14
Loiret . . . . .	38	Seine . . . . .	595
Lorraine . . . . .	13	Seine-Inférieure . . . . .	41
Lot . . . . .	14	Seine-et-Marne . . . . .	20
Maine-et-Loire . . . . .	24	Seine-et-Oise . . . . .	192
Manche . . . . .	5	Somme . . . . .	53
Marne . . . . .	28	Vendée . . . . .	3
Marne (Haute-) . . . . .	23	Vienne . . . . .	7
Mayenne . . . . .	3	Vienne (Haute-) . . . . .	13
Meurthe-et-Moselle . . . . .	41	Vosges . . . . .	13
Meuse . . . . .	5	Yonne . . . . .	27
Morbihan . . . . .	29		
Nièvre . . . . .	29	Total . . . . .	1.777

#### Personnes traitées mortes de la rage après le traitement.

Thomas (Louis), 36 ans, demeurant à Decize (Nièvre). — Mordu le 7 janvier au nez, au sourcil gauche : 3 morsures pénétrantes qui ont saigné.

Traité du 11 janvier au 3 février.

Pris de rage le 15 mars. Mort à l'hôpital Pasteur le 18 mars.

Chien reconnu enragé par M. Garcin, vétérinaire à Decize.

Le bulbe de Thomas inoculé aux animaux a donné la rage le 26<sup>e</sup> jour. Le bulbe du chien mordeur inoculé à des cobayes a donné la rage le 46<sup>e</sup> jour.

Aubé (René), 9 ans, demeurant à Bû (Eure-et-Loir). — Mordu le 24 avril au mollet droit : 2 morsures pénétrantes qui ont saigné.

Traité du 27 avril au 14 mai.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 8 juillet. Mort à l'hôpital Pasteur le 10 juillet.

Chien reconnu enragé par M. Chapellier, vétérinaire à Houdan.

Hadrot (Denise), 4 ans, demeurant à Ecrème, Seine-et-Marne. — Mordue le 23 mars : quatre morsures pénétrantes aux joues, une à la base du nez.

Traitée du 25 mars au 16 avril.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 16 octobre. Morte à l'hôpital Pasteur, le 20 octobre.

Chien errant qui a disparu après avoir mordu.

Le bulbe de Hadrot inoculé à des animaux a donné la rage le 20<sup>e</sup> jour.



**Personne traitée morte de la rage moins de 15 jours  
après le traitement.**

Labouret (Léon), 47 ans, demeurant à Paris (Seine). — Mordu le 30 juin.  
Deux morsures pénétrantes à l'auriculaire droit.

Traité du 30 juin au 20 juillet.

Pris de rage le 2 août. Meurt à l'hôpital Pasteur le 6 août.

Chien reconnu enragé par M. Vasseur, vétérinaire de la Fourrière.

Le bulbe de Labouret, inoculé aux animaux, a donné la rage le 20<sup>e</sup> jour.

**Personne prise de la rage en cours de traitement.**

Dion (Raymond), 4 ans, demeurant à Saint-Léonard (Oise). — Mordu le  
13 octobre : 8 morsures pénétrantes aux joues, qui ont saigné.

Traité du 16 octobre au 5 novembre.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 5 novembre.  
Mort à l'hôpital Pasteur le 8 novembre.

Chien errant, tué après avoir mordu.

Le bulbe de Dion a donné la rage le 25<sup>e</sup> jour.

*Le Gérant : G. MASSON.*

Published weekly, except on Sundays, and on the 1st of January, 1st of March, 1st of May, 1st of July, 1st of September, 1st of November, and 1st of December.

Subscription price, \$5.00 per annum in advance. Single copies, 15 cents.

Entered as second-class matter, June 26, 1902, under post office No. 109, at Chicago, Ill., under special agreement of post office and inspectors of mail.

Acceptance for mailing at special rate of postage provided for in Act of October 3, 1917, authorized on July 1, 1918.

Postage paid at Chicago, Ill., and at additional mailing offices.

Copyright, 1918, by American Medical Association.

Printed at the American Medical Association, 535 North Dearborn Street, Chicago, Ill.

Published by the American Medical Association, 535 North Dearborn Street, Chicago, Ill.

Subscription price, \$5.00 per annum in advance. Single copies, 15 cents.

Entered as second-class matter, June 26, 1902, under post office No. 109, at Chicago, Ill., under special agreement of post office and inspectors of mail.

Acceptance for mailing at special rate of postage provided for in Act of October 3, 1917, authorized on July 1, 1918.

Postage paid at Chicago, Ill., and at additional mailing offices.

Copyright, 1918, by American Medical Association.

Printed at the American Medical Association, 535 North Dearborn Street, Chicago, Ill.